

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Tomáš Marada

Název závěrečné práce

**Ovlivnění funkce ischemicky poškozených orgánů použitím
perfluorocarbonu (PFC) jako konzervačního roztoku při experimentální
transplantaci pankreatu, ledviny a Langerhansových ostrůvků**

Title

Posttransplant function of ischemically impaired organs (pancreas, kidney,
islets) preserved by perfluorocarbon (PFC).

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. MUDr. Miloš Adamec, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.3.2013

MUDr. Tomáš Marada

Podpis

Identifikační záznam:

MARADA, Tomáš. *Ovlivnění funkce ischemicky poškozených orgánů použitím perfluorocarbonu (PFC) jako konzervačního roztoku při experimentální transplantaci pankreatu, ledviny a Langerhansových ostrůvků. [Posttransplant function of ischemically impaired organs (pancreas, kidney, islets) preserved by perfluorocarbon (PFC)].* Praha, 2013. 84 stran, 2 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Institut klinické a experimentální medicíny. Školitel Adamec, Miloš.

Poděkování:

Děkuji svému současnému školiteli Prof. M. Adamcovi za odborné vedení v přípravě na státní zkoušku a dokončení disertační práce. Velký dík patří mému předchozímu školiteli Prof. F. Saudkovi za pomoc při výběru témat a systematickému vedení při přípravách, úspěšné realizaci a vyhodnocení experimentů tvořících hlavní náplň této práce. Děkuji svým spolupracovníkům Mgr. K. Zacharovové, Ing. I. Brabcové, Mgr. Z. Berkové, paní E. Dovolilové, paní J. Havlíčkové a dalším za pomoc při práci v laboratořích, zpracování výsledků a zajištění technického zázemí.

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR/9183-3 (hodnocení A)
a VZ IKEM G9017 2011-2012.

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
Abstrakt	6
Abstract (English)	7
Úvod	8
Hypotézy a cíle práce	11
Materiál a metodika	12
A) Experimentální zvířata	12
B) Konzervace orgánů	12
C) Izolace Langerhansových ostrůvků	15
D) Transplantace Langerhansových ostrůvků	15
E) Testování vitality Langerhansových ostrůvků	16
F) Odběr a transplantace ledviny u potkana	17
H) Histologická a imunochemická vyšetření	22
G) Odběr a transplantace pankreatu u potkana	23
Výsledky	31
A) Zavedení transplantačních modelů	31
B) Konzervace pomocí TLM zlepšuje přežívání zvířat po transplantaci ledviny	32
C) Konzervace pomocí TLM zlepšuje časnou funkci transplantované ledviny	33
D) Konzervace pomocí TLM snižuje rozsah ischemicko-reperfúzního poškození	33
E) Konzervace pomocí TLM snižuje apoptózu renálních buněk	36
F) Konzervace pankreatu pomocí TLM zvyšuje výtěžnost izolovaných ostrůvků	38
G) Funkce ostrůvků in vitro a in vivo je lepší při použití TLM	38
H) Konzervace pomocí PFH snižuje výskyt časných známek ischemicko-reperfúzního poškození transplantovaného pankreatu	43
Diskuze	46
Závěry	51
Použitá literatura	53
Seznam publikací	59
Seznam příloh	61
Příloha A	62
Příloha B	72

Seznam použitých zkratek

AA	- aorta abdominalis
AMS	- arteria mesenterica superior
AO	- akridinová oranž
ATP	- adenosintrifosfát
Bax	- Bcl2-asociovaný X protein
Bcl2	- B-cell leukaemia/lymphoma 2
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
Edn1	- endotelin 1
E-E	- end to end
E-S	- end to side
FR	- fyziologický roztok
HBSS	- Hank's balanced salt solution
Hmox1	- hemoxygenáza 1
Hspd1	- heat shock protein 1
IPGTT	- intraperitoneální glukózový toleranční test
IR	- ischemicko-reperfúzní
IVGTT	- intravenózní glukózový toleranční test
LO	- Langerhansovy ostrůvky
Lta (TNF β)	- lymfotoxin alpha (tumor necrosis factor β)
NHBD	- non-heart beating donor
PCR	- polymerase chain reaction
PDS	- polydioxanone
PFC	- perfluorocarbon
PFD	- perfluorodecalin
PFH	- perfluorohexyloctan
PI	- propidium jodid
RDS	- respiratory distress syndrome
RNA	- ribonukleová kyselina
SI	- stimulační index
Sod1	- superoxiddismutáza 1
TLM	- two-layer method
TNF β (Lta)	- tumor necrosis factor β (lymfotoxin alpha)
TUNEL	- Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UW	- University of Wisconsin
VCI	- vena cava inferior

Abstrakt

Perfluorocarbyny (PFC) jsou uhlovodíky, ve kterých jsou všechny nebo některé z atomů vodíku nahrazeny atomy fluoru. PFC mají velmi vysokou kapacitu pro rozpouštění kyslíku. Jsou chemicky a biologicky inertní. Nejúspěšnější klinická aplikace PFC je tzv. "two-layer method" (TLM) určená pro konzervaci pankreatu před izolací Langerhansových ostrůvků (LO). TLM je metoda konzervace založená na kombinaci okysličeného PFC a UW roztoku, kterým je PFC převrstvený. V experimentu byla TLM úspěšně použita při transplantaci srdce a střeva. V našich experimentech na syngenních potkanech jsme testovali vliv dlouhodobé studené konzervace pomocí perfluorocarbonu na prevenci tkáňového poškození a zlepšení výsledků transplantace ledviny, pankreatu a LO. U transplantace ledviny a LO jsme použili jako metodu konzervace TLM. V případě transplantace pankreatu jsme pracovali s perfluorohexyloctanem patřícím do nové generace méně lipofilních PFC.

1. Ledviny byly konzervovány po dobu 24 hodin buď v UW roztoku ($n = 16$), pomocí TLM ($n = 16$), nebo byly transplantovány ihned (kontrolní skupina, $n = 12$). U poloviny zvířat z každé skupiny bylo hodnoceno přežívání, u ostatních byly odebrány štěpy k semikvantitativnímu histologickému hodnocení a měření výskytu apoptózy 24 hodin po transplantaci. Dlouhodobé přežívání v UW, TLM a kontrolní skupině bylo 12,5, 62,5 a 100% (UW vs TLM, $p < 0,01$). Mediány hladin kreatininu 24 h po transplantaci byly 381, 299 a 121 $\mu\text{mol/l}$ (UW vs TLM, $p < 0,02$). Histologické vyšetření ukázalo rozsáhlejší poškození tkáně ve skupině UW ve srovnání se skupinou TLM ($p < 0,05$). Apoptóza byla častější ve skupině UW oproti skupině TLM ($p < 0,05$). Tímto experimentem jsme prokázali, že konzervace pomocí PFC jako součásti TLM výrazně zlepšuje výsledky transplantace ledvin u potkana.

2. V dalším experimentu jsme testovali vliv TLM na izolaci a transplantaci LO. Pankreaty byly konzervovány po dobu 24 hodin v UW roztoku ($n = 39$), pomocí TLM ($n = 35$), nebo byly použity k izolaci LO bez předchozí konzervace ($n = 10$). Ve srovnání s konzervací pomocí UW roztoku jsem prokázali signifikantně vyšší výtěžnost a lepší výsledky následně transplantovaných LO po použití TLM.

3. Na modelu orgánové transplantace pankreatu jsme hodnotili význam perfluorohexyloctanu (PFH) pro dlouhodobou studenou konzervaci orgánu. Heterotopická transplantace pankreatu probíhala u syngenních potkanů kmene Brown-Norway. Odebrané orgány byly konzervovány po dobu 18 hodin v okysličeném PFH ($n = 8$), nebo v UW roztoku ($n = 8$), nebo byly transplantovány okamžitě v kontrolní skupině ($n = 8$). Dvě hodiny po reperfuzi jsme odebrali krev a vzorky tkáně pankreatu pro biochemické vyšetření a genovou analýzu (real-time PCR).

Významný rozdíl mezi UW a PFH skupinou byl zaznamenán u genu pro TNF α a endotelin 1, který byl exprimován více než dvojnásobně ve skupině s UW roztokem. Skupina UW ve srovnání se skupinou PFH vykazovala významně vyšší hodnoty pankreatické amylázy a lipázy ($94,2 \pm 25,2$ vs $67,7 \pm 13,4$ $\mu\text{kat/l}$ a $5,5 \pm 2,8$ vs $3 \pm 0,7$ $\mu\text{kat/l}$, $p < 0,05$). Tato zjištění naznačují nižší míru ischemicko-reperfuzního poškození ve skupině PFH.

V našich experimentech jsme prokázali lepší výsledky transplantace po dlouhodobé studené konzervaci pomocí PFC ve srovnání s konvenční metodou konzervace pomocí UW roztoku pro ledvinu, pankreas a LO.

Klíčová slova: apoptóza – ischemicko-reperfuzní poškození – konzervace – Langerhansovy ostrůvky – ledvina – pankreas – perfluorocarbon – potkan – roztok University of Wisconsin – two-layer method

Abstract (English)

Perfluorocarbons (PFC) are hydrocarbons in which some or all of the hydrogen atoms are replaced with fluorine. PFC have a very high capacity for dissolving oxygen. They are chemically and biologically inert. The most successful clinical application of PFC is the "two-layer method" for pancreas preservation before islet isolation. The two-layer organ preservation method (TLM) is based on oxygenated perfluorocarbon overlaid with University of Wisconsin (UW) solution. In experiment it has been successfully used for heart and intestine transplantation. We tested whether this technique would prevent tissue damage and improve results of kidney, pancreas and islets of Langerhans transplantation with prolonged ischemia time in an experimental model of syngenic rats. In kidney and islets of Langerhans transplantation model we used TLM preservation method. In pancreas transplantation model we used perfluorohexyloctane (PFH) as a new generation of less lipophilic PFC.

1. Kidneys were stored for 24 hours either in UW solution (n = 16), with TLM (n = 16) or transplanted immediately (control group, n = 12). In half of the animals, survival was observed and in the other animals grafts were procured for semiquantitative histological scoring and TUNEL apoptosis assessment 24 h after transplantation. One-month survival rates in the UW, TLM and control groups were 12.5, 62.5 and 100%, respectively (UW vs. TLM, $p < 0.01$). Median creatinine levels 24 h after transplantation were 381, 299 and 121 $\mu\text{mol/l}$, respectively (UW vs. TLM, $p < 0.02$). Histological scoring showed more severe tissue damage in the UW group than in the TLM group ($p < 0.05$). Apoptosis was more frequent in the UW group than in the TLM group ($p < 0.05$). In this experiment we demonstrated that conservation with PFC as a component of the "two-layer method" significantly improves the outcome of kidney transplantation in a rat model.

2. In the next step, we tested impact of TLM on islet isolation and transplantation. Pancreata were stored for 24 hours in UW solution (n=39), with TLM (n=35) or used for islet isolation immediately without preservation (n=10). We proved significantly higher islet yield and improved outcome after transplantation using TLM compared to conventional static cold preservation in UW solution.

3. In the model of pancreas transplantation we evaluated the impact of perfluorohexyloctane on long-term cold storage in a rat whole pancreas transplantation model. Brown-Norway rats were used for syngeneic heterotopic pancreas transplantation. The procured organs were cold-stored for 18 hours in preoxygenated PFH (PFH group) (n=8) or in the University of Wisconsin solution (UW group) (n=8) or were transplanted immediately in the control group (n=8). Two hours after reperfusion, we obtained blood and pancreas tissue samples for biochemistry and gene analyses (real-time PCR). A significant difference between the UW and PFH group was observed in the TNF β and endothelin 1 genes, which was overexpressed more than twofold in the UW group. In the blood samples, the UW group compared with the PFH group showed significantly higher levels of pancreatic amylase and lipase (94.2 ± 25.2 vs. 67.7 ± 13.4 $\mu\text{kat/l}$ and 5.5 ± 2.8 vs. 3 ± 0.7 $\mu\text{kat/l}$, respectively; $p < 0.05$). These findings suggest lower rate of ischaemic reperfusion injury in the PFH group.

In our experiments we confirmed superiority of long-term cold storage with PFC for kidney, pancreas and islets of Langerhans transplantation compared to conventional cold preservation in UW solution.

Key words: apoptosis – ischaemic-reperfusion injury – islet of Langerhans – kidney – pancreas – perfluorocarbon – preservation – rat – two-layer method – University of Wisconsin solution

Úvod

Transplantologie patří stále k nejvíce progresivním oborům medicíny. Za poslední století prodělala obdivuhodný vývoj od ojedinělých experimentů ke zlatým standardům léčby řady nevratných orgánových selhání. Navzdory úspěchům se ale stále potýká s několika dlouhodobými problémy, jakými je nedostatek a kvalita orgánů, vhodné ovlivnění imunity atd. Jednou z oblastí současného výzkumu je i snaha o snížení ischemicko-reperfuzního poškození přispívajícího významně ke zhoršené funkci a přežívání transplantovaných štěpů [1]. Týká se to především délky a způsobu konzervace odebraných orgánů. Nejčastěji používaným způsobem konzervace orgánů v současné době je metoda statické studené konzervace. Důvodem je především jednoduchost a srovnatelná účinnost s technicky náročnějšími způsoby konzervace (např. pulzatilní perfuzí). Hlavním principem statické studené konzervace je snížení ischemického poškození odebrané tkáně resp. orgánu pomocí protektivních roztoků spolu s ochlazením štěpu na teplotu 0-4 st. Celsia vedoucím ke snížení metabolismu pod 10% [2,3]. Navzdory radikálnímu snížení metabolismu dochází i při tomto způsobu konzervace k dalšímu, byť pozvolnému poškozování štěpu ischemií, prohloubenému navíc reperfuzním poškozením po následné transplantaci. Zlepšení výsledků může přinést současné okysličování konzervovaného štěpu, které ale doposud naráží na technickou náročnost bránící jeho širšímu použití. Jednou z nadějných možností řešení tohoto problému je použití perfluorocarbonu, který je předmětem výzkumu prezentovaného v této práci.

Perfluorocarbyny (PFC) jsou skupinou uhlovodíků, ve kterých jsou některé nebo všechny atomy vodíku nahrazeny atomy fluoru. PFC mají velmi vysokou kapacitu pro rozpustnost kyslíku. V porovnání s vodou je rozpustnost kyslíku v PFC 20x až 25x vyšší [4]. Díky této vlastnosti se stal PFC ideálním médiem pro oxygenaci explantovaného orgánu. Poskytuje orgánu prakticky fyziologickou hladinu parciálního tlaku kyslíku [5].

Použití PFC k oxygenaci explantovaného orgánu může prodloužit dobu mezi explantací a transplantací [5]. Umožňuje zlepšit funkci orgánu poškozeného teplou ischemií [6,7]. Dostupnost použitelných orgánů tím může být rozšířena i o dárce s nebijícím srdcem (NHBD). V případě pankreatu použití PFC zvyšuje dostupnost Langerhansových ostrůvků z pankreatu [8,9] a umožní jejich izolaci i od marginálních dárců [10].

PFC je v transplantační medicíně využíván ke konzervaci odebraných orgánů již mnoho let. Přestože byl použit jako konzervační medium i samostatně [11], širší využití získal až v kombinaci s UW roztokem jako tzv. TLM (two-layer method) [12]. Uchovávání pankreatu v PFC prodlužuje dobu jeho použitelnosti k izolaci a transplantaci Langerhansových ostrůvků a navíc zvyšuje dostupnost Langerhansových ostrůvků z konzervovaného pankreatu [13,14], která je délkou studené ischemie významně zhoršena [15].

PFC byl doposud použit ke konzervaci srdce [16], tenkého střeva [17], jater [18] a plic [19] na zvířecích modelech. Nejlepší výsledky a nejčastější využití nachází při konzervaci pankreatu [20]. Klinicky byl využit k transplantaci pankreatu [21] a častěji pak k izolaci Langerhansových ostrůvků [22]. Přestože byl mnohokrát prokázán význam PFC pro úspěšnou konzervaci orgánů před transplantací, nebyl PFC nikdy uveden do širšího klinického využití [23].

Dosud nejfrekventovanější využití PFC v transplantační medicíně je jako součást TLM [24]. Tato metoda používá dvě protektivní media. PFC sycený kyslíkem a UW konvenční konzervační roztok poskytující substrát pro syntézu ATP, scavengery k neutralizaci kyslíkových radikálů a vhodný poměr iontů ke stabilizaci buněčných membrán [25].

Vzhledem k rozdílné specifické hmotnosti se obě substance vzájemně nemísí, rozdělují se do dvou vrstev. Konzervovaný orgán je umístěn na rozhraní obou vrstev. Použití TLM přináší v experimentu významně lepší výsledky, než konzervace pouze UW roztokem [26].

PFC byl poprvé syntetizován ve 20.-tých letech 20. století. Průmyslově vyráběn začal být ve 40.-tých letech v rámci projektu Manhattan. V medicíně nachází uplatnění od 60.-tých let jako respirační tekutina v léčbě RDS (Respiratory Distress Syndrome) u nedonošených dětí (Perflubron) pro snadné vázání kyslíku a biologickou inertnost. Poprvé byla tato jeho vlastnost demonstrována v roce 1966 Clarkem a Gollanem na pokusu s myší, která přežívala v oxygenovaném PFC několik hodin [27]. Další medicínské uplatnění nachází PFC například v oftalmologii [28] a transplantologii (viz níže).

Ze široké skupiny perfluorocarbonů nachází v poslední době nejslibnější využití perfluorohexyloctan (PFH), který umožňuje lepší pronikání kyslíku do tkání, než dříve používaný perfluorodecalin [29]. Na jeho využití jsme se zaměřili i v našem projektu, a to při orgánové transplantaci pankreatu.

Hypotézy a cíle práce

Pracovní hypotéza vycházela z předpokladu, že použití PFC při konzervaci orgánů (pankreatu a ledviny) zlepši bezprostřední efekt transplantace ischemicky poškozeného orgánu. Při srovnání standardní konzervace orgánu v UW roztoku a PFC jsme předpokládali dosažení lepších výsledků v případě PFC. Zatímco tato metoda byla již dříve testována v oblasti transplantace Langerhansových ostrůvků a byla v některých pracovištích navržena jako součást konzervačního postupu před samotnou izolací ostrůvků, v případě konzervace ledvin nebyla tato slibná metoda dosud testována.

Cílem práce bylo prověřit protektivní vliv perfluorocarbonu (PFC) samotného i v kombinaci s roztokem UW (University of Wisconsin) jako součásti tzv. dvojvrstevné metody (TLM, „Two-Layer Method“) při konzervaci ledviny a pankreatu v experimentu na potkanech.

Konkrétní cíle experimentálního projektu:

1. Zjistit, jestli použití PFC zlepši bezprostřední efekt transplantace ischemicky poškozeného štěpu ledviny.
2. Zjistit, jestli použití PFC zlepši výtěžnost a in vitro testovanou funkční schopnost Langerhansových ostrůvků a získat tak podklady pro zařazení tohoto způsobu konzervace pankreatu do protokolu izolace Langerhansových ostrůvků pro klinické účely.
3. Zavést model experimentální orgánové transplantace pankreatu u potkana a testovat, zda konzervace pomocí PFC sníží rozsah ischemicko-reperfuzního poškození štěpu po transplantaci.

Materiál a metodika

A) Experimentální zvířata

Pro nácvik mikrochirurgické techniky byli použiti potkani kmene Lewis. Jako dárci orgánů v experimentálních studiích pro transplantaci ledviny, pankreatu a izolovaných Langerhansových ostrůvků byli použiti potkani kmene Brown-Norway. In vivo funkce izolovaných Langerhansových ostrůvků byla testována u imunodeficientních myši kmene NuNu. Diabetes byl u nich navozen intraperitoneálním podáním streptozotocinu (2 mg/10 g). Do týdne byl diabetes potvrzen opakovaným průkazem hyperglykémie nad 18 mmol/l v průběhu tří po sobě následujících dní. Glykémie byla měřena v kapilární krvi ze špičky ocasu. Za příjemce ledviny a pankreatu byli použiti syngenní potkani kmene Brown-Norway. Se zvířaty bylo zacházeno v souladu se zákonem č. 246/92 Sb., projekt pokusů byl schválen Komisí pro ochranu zvířat a operační výkony byly prováděny chirurgem školeným v mikrochirurgické technice s osvědčením pro práci s laboratorními zvířaty (§17 odst.1 zákona č.276/1992 Sb).

B) Konzervace orgánů

Bezprostředně po odběru byly orgány propláchnuty přes arteriální zásobení studeným fyziologickým roztokem a 100 j. heparinu. Orgány byly transplantovány buď bezprostředně po odběru, nebo následovala další perfuze studeným UW roztokem (3 ml u ledviny a 5 ml u pankreatu). Takto ošetřené orgány byly následně uchovávány po dobu 24 hodin konvenčním způsobem ve studeném UW roztoku nebo pomocí TLM. Vzhledem k rozdílné specifické hmotnosti se PFC a UW roztok vzájemně nemísí a rozdělují se do dvou vrstev. Konzervovaný orgán byl umístěn na rozhraní obou vrstev. PFC (spodní

vrstva) byl sycen bezprostředně před konzervací orgánu kontinuálním probubláváním 100% kyslíkem po dobu 20 minut [30]. Pro náš experiment byl PFC (perfluorodecalin – PFD) získán od firmy F2 Chemicals Ltd.

Pro účely konzervace orgánů pomocí TLM jsme zkonstruovali z plexiskla speciální komůrku ve tvaru válce o vnějším průměru 60 mm, vnitřním průměru 40 mm a výšce 70 mm (obr. 1).

Před odběrem orgánu k následné konzervaci jsme komůrku naplnili 20 ml studeného PFC (4°C), který jsme po dobu 20 min sytili kontinuálním probubláváním 100% kyslíkem.

Následně jsme PFC převrstvili 20 ml studeného UW roztoku (4°C). Do komůrky jsme umístili odebraný orgán (ledvinu resp. pankreas) a fixovali jej v poloze mezi oběma vrstvami pomocí kovové sítě. Komůrku s orgánem jsme pak udržovali při teplotě 4°C po dobu 24 hodin.



Obr. 1

Konzervace ledviny pomocí TLM ve speciálně vyrobené komůrce.

(UW – University of Wisconsin konzervační roztok, PFC – perfluorocarbon)

C) Izolace Langerhansových ostrůvků

LO byly izolovány buď z bezprostředně odebraného pankreatu (kontrolní skupina) nebo z pankreatů konzervovaných po dobu 24 hodin pomocí TLM nebo v samotném UW roztoku. Pankreas byl odebrán se segmentem duodena a se slezinou. Ductus choledochus byl kanylován již před konzervací. Po konzervaci bylo cévní svorkou uzavřeno ústí ductus choledochus v oblasti Vaterovy papily. Přes kanylu byl pankreas naplněn 15 ml roztoku kolagenázy v HBSS (Hank's balanced salt solution) o koncentraci 1 mg/ml (Kolagenáza; Sevapharma, ČR). Distendovaný orgán byl umístěn do zkumavky a za mírného třepání inkubován 20 min při 37°C. Jednotlivé složky tkáňové suspenze byly odděleny pomocí hmotnostního gradientu. Po 20 minutách centrifugace při 4°C a 610 G byly separované ostrůvky sbírány pipetou z rozhraní posledních dvou vrstev a promyty v HBSS.

D) Transplantace Langerhansových ostrůvků

V celkové anestézii (Domitor + Narketan i.m.) byla provedena levostranná lumbotomie, ze které jsme obnažili konvexitu levé ledviny. Poté byla pod kapsulu ledviny zavedena kanyla 0,7 x 19 mm a aplikována suspenze ostrůvků. Rána byla uzavřena po vrstvách pokračovacím stehem.

E) Testování vitality Langerhansových ostrůvků

Vitalita ostrůvků byla testovaná pomocí fluorescenčních barev propidium jodid (PI) a akridinová oranž (AO). PI vstupuje přes membránu mrtvých nebo umírajících buněk, kde se váže na nukleové kyseliny a intenzívně je barví na červenou. AO v nízkých koncentracích vstupuje přes membránu živých buněk a barví jejich cytoplazmu na zeleno. Pod fluorescenčním mikroskopem byly ostrůvky rozděleny do skupin podle procentuálního zastoupení nekrotických buněk 0-25, 26-50, 51-75, 76-100% a na základě toho byla stanovena celková vitalita.

Schopnost ostrůvků produkovat inzulin byla stanovena in vitro pomocí statických inkubací. Základní roztok pro tento test se skládá z ekvivalentního množství roztoků Krebs I (NaCl 26,892 g/l), Krebs II (KCl 1,490 g/l + NaHCO₃ 8,064 g/l + MgCl₂ 0,814 g/l) a Krebs III (CaCl₂ 1,11 g/l). Do pracovního roztoku se glukóza nepřidává, slouží na promytí ostrůvků. V bazálním roztoku je koncentrace glukózy 3,3 mmol/l, ve stimulačním je 22 mmol/l. Ostrůvky se inkubují 60 minut v bazálním roztoku, pak 60 minut ve stimulačním a nakonec opět 60 minut v bazálním roztoku. Po každé inkubaci se odebere vzorek média pro stanovení koncentrace inzulinu pomocí ¹²⁵I RIA Kit (ICN Pharmaceuticals, USA). Vzhledem k variabilitě použitých ostrůvků se stanovuje tzv. stimulační index (množství uvolněného inzulinu po stimulaci k množství uvolněného inzulinu v první nestimulační kultuře). Po skončení inkubací byly ostrůvky zmrazeny a uchovány pro stanovení celkového množství inzulinu.

Vitalita in vivo:

Schopnost transplantovaných ostrůvků produkovat inzulin in vivo byla vyšetřena intraperitoneálním glukózovým tolerančním testem (IPGTT) ve 2. a v 8. týdnu po transplantaci. 1mg glukózy/g hmotnosti zvířete byl aplikován intraperitoneálně a ve stanovených intervalech: před aplikací a pak 5, 15, 30, 60 a 120 minut po aplikaci byla měřena glykémie. Schopnost transplantovaných ostrůvků vyléčit streptozotocinový diabetes příjemců byla monitorována pravidelným měřením glykemií.

Histologie:

Pro definitivní potvrzení schopnosti transplantovaných LO vyléčit diabetes, byla v 8. týdnu provedena nefrektomie ledviny, do které byly transplantovány LO.

Ledvina byla fixovaná pufovaným 10% formaldehydem a vložena do parafinu. 4 µm tlusté řezy pak byly deparafinovány xylenem a rehydratovány v etanolu se stoupající koncentrací.

Ledviny pak byly barveny hematoxylinem a eozinem pro identifikaci transplantovaných LO.

Izolace a testování vitality Langerhansových ostrůvků probíhalo v Laboratoři

Langerhansových ostrůvků IKEM (Mgr. Zuzana Berková).

F) Odběr a transplantace ledviny u potkana

Zvolili jsme metodu ortotopické transplantace levé ledviny mezi syngenními potkany kmene Brown-Norway po oboustranné nefrektomii vlastních ledvin příjemce. Za těchto experimentálních okolností má kvalita transplantované ledviny zásadní význam pro přežívání příjemce a naopak přežití příjemce je dokladem příznivě se rozvíjející funkce transplantovaného orgánu.

Před odběrem a transplantací ledviny necháváme zvířata lačnit 12 hodin s volným přístupem k vodě. Teplota v laboratoři je udržována na 23°C. Operační výkony byly prováděny v celkové intramuskulární anestézii směsí Ketaminu 10mg/100g s Xylazínem 1,5mg/100g.

Operace dárce:

V celkové intramuskulární anestezii, po střední laparotomii od mečíku k symfýze preparujeme levou ledvinu. Mobilizujeme a separujeme renální cévy v rozsahu od hilu ledviny k jejich odstupům z aorty a dolní duté žíly. K přerušování menších cév používáme elektrokoagulaci, větší cévy přerušujeme mezi podvazy. Ureter preparujeme a přerušíme nad močovým měchýřem. Po intravenózní aplikaci heparinu v dávce 20 IU/100g nakládáme svorky na renální cévy v místě jejich odstupů z aorty a dolní duté žíly. Přerušíme renální cévy těsně u svorek, aby byly co nejdelší a štěp perfundujeme ex vivo 3 ml heparinizovaného studeného UW roztoku (4°C) pro pozdější konzervaci, resp. studeného fyziologického roztoku k bezprostřední transplantaci. Eutanazii dárce provádíme exsanguinací.

Ortotopická transplantace levé ledviny:

V celkové intramuskulární anestezii provedeme střední laparotomii od symfýzy k proc. xyphoideus, Tenké a tlusté střevo odsuneme na pravou stranu zvířete a zabalíme do vlhké gázy. Preparujeme levou ledvinu, cévní stopku a její močovod. Svorky na renální cévy nakládáme v místě jejich odstupů z aorty a dolní duté žíly. Cévy následně přerušujeme v hilu, aby zůstaly co nejdelší, ureter přetínáme v úrovni dolního pólu ledviny. Ledvinu odstraníme a na její místo vkládáme ledvinu dárce. Provádíme postupně tepennou (Obr. 2) a žilní (Obr. 3) anastomózu renálních cév end-to-end (E-E) pokračujícím stehem nylon 10/0 resp. 9/0. Po reperfuzi štěpu ledviny (Obr. 4) dokončujeme transplantaci E-E anastomózou ureteru stehem nylon 10/0 (Obr. 5). Po dokončení transplantace podvazujeme a přerušujeme cévní stopku

a močůvody pravé vlastní ledviny a ledvinu odstraňujeme. V těle příjemce tak zůstává pouze transplantovaná ledvina. Před suturou břišní stěny aplikujeme 5 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně a subkutánně.

Pooperační péče:

Po transplantaci ledviny podáváme vodu a potravu ihned po výkonu. Bolest v pooperačním průběhu byla u zvířat tlumena dávkovanou analgezií (buprenorfin 0,05 – 0,1 mg/kg v intervalu 8 hod s.c. a ketoprofen 5mg/kg v intervalu 16-24 hod s.c.).

Uspořádání studie:

K posouzení vlivu TLM při dlouhodobé konzervaci ledviny jsme sestavili 3 skupiny:

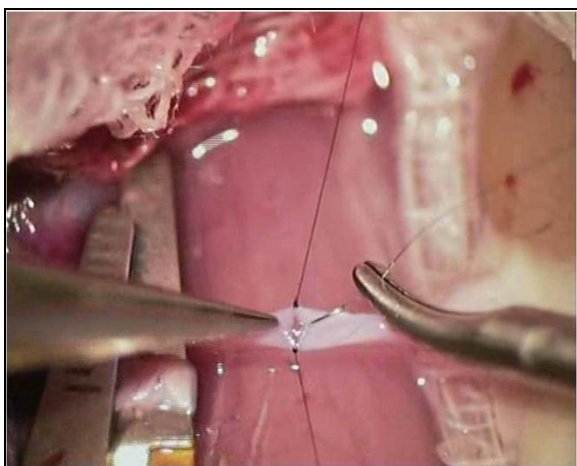
skupina 1 (n=16) - štěp transplantovaný po 24 hod konzervace v UW roztoku při teplotě 4°C

skupina 2 (n=16) - štěp transplantovaný po 24 hod konzervace pomocí TLM při teplotě 4°C

skupina 3 (n=12) - kontrolní, s bezprostředně transplantovaným štěpem ledviny

Manipulační čas našívání cévních anastomóz byl v průměru 24 minut (min-max, 19-29) bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami.

U poloviny transplantovaných v každé skupině (8, 8 a 6, náhodně vybraných) bylo sledováno pouze přežívání. U ostatních zvířat ve skupinách bylo provedeno biochemické vyšetření krve a odběr ledviny k histologickému vyšetření a zhodnocení míry apoptózy 24 hodin po transplantaci. Jelikož byla u všech příjemců ledvin provedena zároveň oboustranná nefrektomie, přežívání příjemců přímo souviselo s přežíváním štěpů.



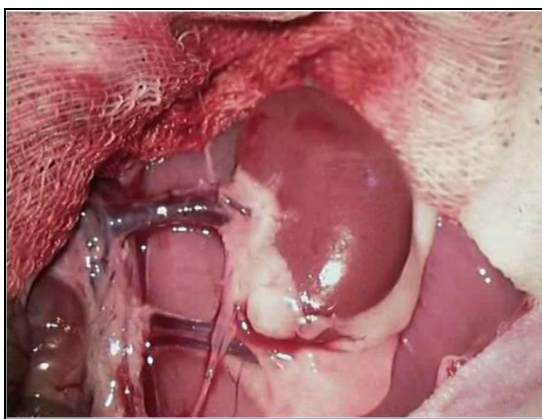
Obr. 2

Tepenná anastomóza renální tepny E-E.



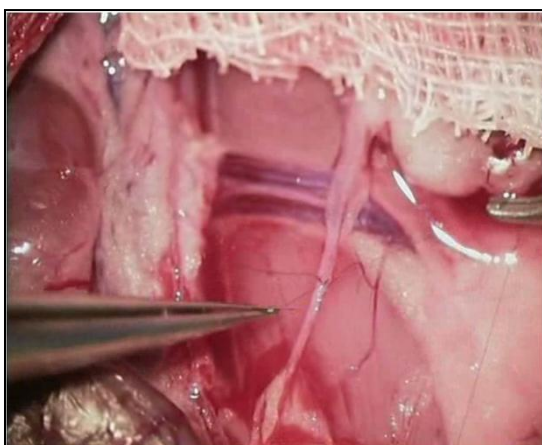
Obr. 3

Anastomóza renální žíly E-E.



Obr. 4

Reperfúze štěpu ledviny.



Obr. 5

Anastomóza ureteru E-E.

H) Histologická a imunochemická vyšetření

Polovina odebrané ledviny byla fixována v 4% formaldehydu, zalita do parafínu a nakrájena na řezy o tloušťce 5 μm . Morfologické změny buněk tubulů jsme hodnotili na řezech barvených hematoxylinem a eosinem. Glomeruly nevykazovaly výrazné známky ischemicko-reperfuzního poškození, proto nebyly dále podrobněji hodnoceny. Histologické známky poškození v oblasti kortexu ledviny jsme hodnotili semikvantitativně na 25-ti náhodně vybraných nepřekrývajících se mikrofotografiích z každého vzorku. Fotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus DP71 s objektivem pro 40-ti násobné zvětšení.

Mikrofotografie zachycovala pole o velikosti 430x320 μm . Hodnocení jednotlivých vzorků bylo prováděno dvěma nezávislými pracovníky bez znalosti přidělení preparátů k jednotlivým experimentálním skupinám. Na mikrofotografiích jsme kvantitativně hodnotili stupeň poškození tubulů [31]. Normální obraz nepoškozené tkáně byl hodnocen jako stupeň 1, atrofie epitelálních buněk, rozšíření bazální membrány a intersticiální edém jako stupeň 2 a nekróza buněk tubulů s destrukcí buněčných jader a deskvamací epitelii jako stupeň 3 (Obr. 11).

U každého preparátu byl pak stanoven plošný procentuální výskyt jednotlivých stupňů poškození.

TUNEL assay v kombinaci se značením glomerulů pomocí imunofluorescence.

Druhá polovina odebrané ledviny byla zpracována k současnému imunofluorescenčnímu označení glomerulů a detekci apoptózy pomocí metody TUNEL. Tkáň jsme fixovali Bouinovým roztokem, promyli v PBS, prosytili 30% sacharózou, zalili do O.C.T. Compound/Tissue Tek (Sakura Finetek) a zmrazili. Tkáň na kryorezech byla permeabilizována 0,1% roztokem Triton X-100 (Sigma). Následně byly řezy ošetřeny roztokem Tris-HCl (0,05 M, pH 10) za působení mikrovln. Glomeruly byly detekovány pomocí králíčích protilátek proti

podocalyxin-like protein-1 (Santa Cruise Biotechnology, Inc.) s následnou inkubací s druhově specifickými protilátkami značenými Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Molecular Probes).

TUNEL metoda byla prováděna s použitím kitu In Situ Cell Detection, Fluorescein (Roche).

Řezy byly inkubovány s reakční směsí roztoků TUNEL Enzyme a TUNEL Label po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C. Enzymatická reakce byla ukončena pufrem 2xSSC (Sigma).

Následně byla jádra na řezech dobarvena roztokem Dapi (Fluka). Preparáty byly montovány roztokem Dabco, Mowiol a glycerolu. TUNEL pozitivní kontrola byla získána inkubací tkáně s rekombinantní DNAsou (Roche)- 6 U/ml v 50mM roztoku Tris-HCl s 1 mM MgCl

a 1 mg/ml BSA po dobu 10 min při teplotě 37 °C. Negativní kontrola byla získána vynecháním roztoku Enzyme Label z reakční směsi. Z každého preparátu jsme pomocí imunofluorescenčního mikroskopu Olympus BX41 opatřeného digitálním fotoaparátem pořídili 10 náhodně vybraných nepřekrývajících se mikrofotografií. Při zvětšení objektivu 40-krát zachycovala mikrofotografie pole o velikosti 430x320 µm. Apoptotické buňky jsme počítali zvlášť v glomerulech a tubulech.

G) Odběr a transplantace pankreatu u potkana

Zvolili jsme model heterotopické transplantace pankreatikoduodenálního štěpu [32] mezi syngenními potkany kmene Brown-Norway (u samotného experimentu) resp. Lewis (při nácviku) na infrarenální oblast abdominální aorty, se systémovou krevní drenáží do dolní duté žíly. Drenáž exokrinní sekrece byla zajištěna enteroentero anastomózou do tenkého střeva příjemce.

Předoperační příprava a anestézie:

Před odběrem a transplantací pankreatu necháváme zvířata lačnit 12 hodin. Přístup k vodě je dle potřeby. Teplota v laboratoři je udržována na 23°C. Operační výkony byly prováděny v celkové intramuskulární anestézii směsí Ketaminu 10mg/100g s Xylazínem 1,5mg/100g.

a) Operace dárce

V celkové intramuskulární anestezii (směsí Ketaminu 10mg/100g s Xylazínem 1,5mg/100g), po střední laparotomii a oboustranném subkostálním řezu preparujeme tenké střevo od sestupného tračníku. Dále odstraňujeme velkou předstěru. K přerušování menších cév používáme elektrokoagulaci, větší cévy přerušujeme mezi podvazy. Slezinu v průběhu preparace neoddělujeme, abychom ji mohli použít k bezdotykové manipulaci se slinivkou, čímž chráníme slinivku před poraněním. Cévy mesokolon přerušujeme při dolním okraji pankreatu. Hlavu pankreatu oddělíme tupou preparací od mesocolon transversum. Pak pokračujeme s preparací v oblasti pyloru, kde přerušujeme a. gastroepiploica dextra odstupující z a. gastroduodenalis. Ductus choledochus a arteria hepatica přerušíme v jaterním hilu. Horní mezenterické cévy podvážeme a přerušíme za odstupem dolních pankreatikoduodenálních větví při dolním okraji pankreatu. Dále překlopíme pankreas k pravé straně těla zvířete a preparujeme aortu v úseku od bránice k renálním tepnám. V tomto segmentu ponecháváme pouze truncus coeliacus a horní mezenterickou tepnu (AMS), ostatní větve podvážeme a přerušíme. Podáváme heparin intravenózně v dávce 10 j./100g. Aortu připravíme ke kanylaci podvazem pod AMS a naložením cévní svorky nad truncus coeliacus (Obr. 6). Poté pankreas perfundujeme 5 ml 4°C fyziologického roztoku s heparinem. Aortu přerušíme nad cévní svorkou a pod podvazem. Proximální konec ponecháme otevřený pro pozdější E-S (end to side) anastomózu s aortou příjemce. Portální žílu přerušíme co nejvýš v jaterním hilu. Duodenum přerušíme v místech naznačených perfuzí (Obr. 7 – Lee 1986).

Segment duodena propláchneme studeným fyziologickým roztokem a orální konec uzavřeme ligaturou nylon 5/0. Eutanazii dárce provádíme exsanguinací.

b) Konzervace orgánů

Bezprostředně po odběru je pankreas okamžitě propláchnut přes arteriální zásobení studeným fyziologickým roztokem se 100 j. heparinu. Orgány byly buďto hned tansplantovány, nebo následovala další perfúze studeným UW roztokem. Takto ošetřené orgány byly následně uchovávány po dobu 18 hodin buď konvenčním způsobem ve studeném UW roztoku nebo v preoxygenovaném PFH při teplotě 4°C. PFH byl pro náš experiment získán od firmy Novaliq GmbH z Heidelbergu.

c) Heterotopická transplantace pankreatu se systémovou venózní drenáží

V celkové intramuskulární anestezii provedeme střední laparotomii od symfýzy k processus xyphoideus. Tenké a tlusté střevo odsuneme na pravou stranu zvířete a zabalíme do vlhké gázy. Tupou preparací obnažíme infrarenální úsek dolní duté žíly (VCI) a břišní aorty (AA). Cévy uvolníme v rozsahu cca 20 mm, lumbální větve podvážeme a přerušíme.

Pankreatikoduodenální štěp zabalený do studené vlhké gázy umístíme na pravou stranu zvířete. Na VCI a AA naložíme cévní svorky. Provedeme podélnou aortotomii a venotomii v rozsahu korespondujícím s lumen segmentu aorty štěpu a 2-3 násobným oproti průměru portální žíly (široká žilní anastomóza je důležitá pro prevenci žilní trombózy ve štěpu). Cévy propláchneme fyziologickým roztokem s heparinem. Nejprve šijeme anastomózu portální žíly na VCI E-S po fixování porty v protilehlých pólech k oběma pólům incize ve VCI.

U anastomózy šijeme nejdříve zadní a poté přední stěnu pokračujícím stehem nylon 9/0.

Stejně postupujeme u tepenné anastomózy (Obr. 8). Po uvolnění cévních svorek dochází k reperfuzi štěpu (Obr. 9). Následuje side-to-side anastomóza duodena štěpu stehem PDS 7/0

na první jejunální kličku po její podélné enterotomii na antimezenterální straně (Obr. 10).

Pankreas umístíme retrokolicky pod colon descendens. Před suturou břišní stěny aplikujeme 10 ml FR a 5% Glukózy 1:1 intraperitoneálně a subkutánně.

Pooperační péče:

Po transplantaci pankreatikoduodenálního štěpu podáváme zvířatům směs FR a 5%G 1:1 ihned po výkonu, potravu nejdříve po 12 hodinách. V případě zřejmých technických neúspěchů byla zvířata usmrcena stupňovanou anestézií. U ostatních zvířat byla bolest v pooperačním průběhu tlumena dávkovanou analgezií (buprenorphin 0,05 – 0,1 mg/kg v intervalu 8 hod s.c. a ketoprofen 5mg/kg v intervalu 16-24 hod s.c.). Glykémii z kapilární krve jsme měřili denně. Jednou týdně jsme prováděli IVGTT (intravenózní glukózový toleranční test). Za úspěšnou transplantaci pankreatu u potkana se streptozotocinem indukovaným diabetem jsme považovali takovou, která navodila dlouhodobou (tj. více než 30-ti denní) normoglykémii.

K nácviku techniky odběru a transplantace pankreatikoduodenálního štěpu jsme používali normoglykemické potkany kmene Lewis.

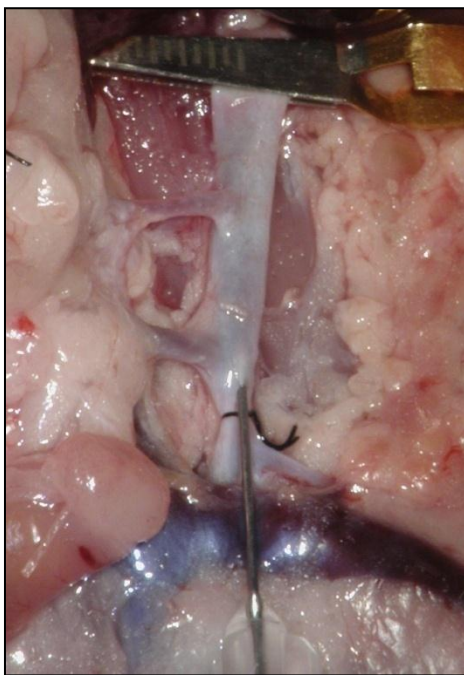
K hodnocení úspěšnosti transplantace pankreatu u syngenních potkanů kmene Brown Noway jsme použili příjemce s diabetem, který jsme indukovali intravenózní aplikací streptozotocinu v dávce 70 mg/kg 5-7 dnů před plánovanou transplantací. Spolehlivost navozeného diabetu jsme kontrolovali měřením glykémie, kritériem diabetu byla hodnota glykémie nad 18 mmol/l 3 dny po sobě.

Uspořádání studie:

K nácviku odběru a transplantace pankreatikoduodenálního štěpu bylo použito 40 potkanů kmene Lewis. Úspěšné transplantace s dlouhodobým přežíváním příjemců se podařilo

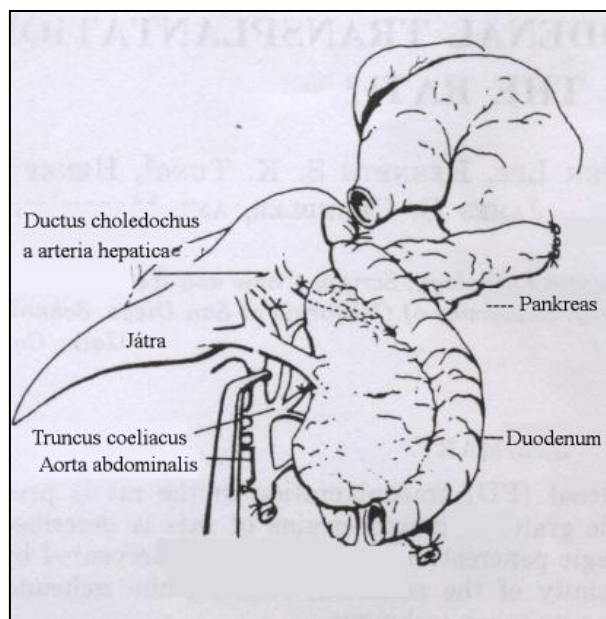
dosáhnout zkrácením doby našívání cévních anastomóz, dodržením „no touch“ techniky manipulace s pankreatem, pečlivým perioperačním a pooperačním sledováním, udržováním konstantní tělesné teploty a minimalizací krevních ztrát.

K posouzení vlivu PFH při dlouhodobé konzervaci jsme sestavili 3 skupiny po 8 zvířatech. Heterotopickou transplantaci pankreatu jsme prováděli u syngenních potkanů kmene Brown-Norway 18 hodin po konzervaci pankreatikoduodenálního štěpu ve 4° UW roztoku nebo PFH (skupina 1 a 2) nebo bezprostředně, bez konzervace orgánu (kontrolní skupina 3). 2 hodiny po reperfuzi byly zvířatům odebrány 2 ml krve, štěp pankreatu byl odebrán pro genovou analýzu a zvířata byla usmrcena exsanguinací v pokračující celkové anestezii.



Obr. 6

Kanylace a perfuze segmentu abdominální aorty s ponechanými odstupy AMS (kaudálně) a truncus coeliacus (kraniálně). Dole - levostranná vena renalis, vlevo - tělo a ocas pankreatu odklopený k pravé straně zvířete.



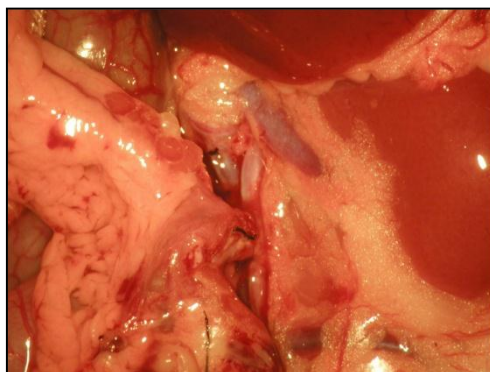
Obr. 7

Schéma odběru pankreatikoduodenálního štěpu (Lee 1986).



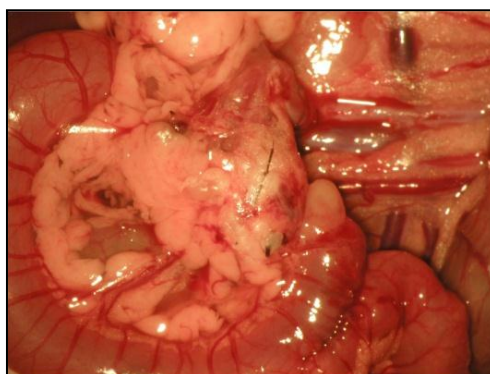
Obr. 8

E-S tepenná a žilní anastomóza pankreatikoduodenálního štěpu na VCI a AA



Obr. 9

Stav po transplantaci pankreatikoduodenálního štěpu bezprostředně po reperfuzi.



Obr. 10

Transplantovaný pankreatikoduodenální štěp s dokončenou side-to-side enteroentero anastomózou (dolní část obrázku)

Real-time PCR

Z tkáně pankreatu odebraného 2 hodiny po reperfuzi byla izolována RNA pomocí komerčního kitu RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) schématem zahrnujícím ošetření DNásou I. Izolace byla prováděna pomocí robotického izolátoru QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) zaručujícího standardizovaný protokol postupu a dobrou porovnatelnost vzorků. RNA byla tímto postupem eluována do 14μl “RNase free” vody a kvantifikována UV – Vis spektrofotometrem (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA). Vzorky RNA byly poté skladovány při stálé teplotě -80°C. Takto připravená RNA byla poté použita pro syntézu komplementární DNA (cDNA) pomocí Superscript II Reverse Transcriptase (Nitrogen, CA, United States) dle výrobcem doporučeného protokolu.

Metodou RT-qPCR, kde jako referenční gen byl dle literárních poznatků zvolen gen pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH), byly následně změřeny expresní profily sedmi cílových genů pro molekuly účastníci se IR poškození (Bcl2, Bax, Hmox1, Edn1, Hspd1, Lta(TNFb), Sod1) u 24 vzorků tkáně pankreatu. Jako kalibrátor pro metodu pak sloužil jeden ze vzorků cDNA patřící do kontrolní skupiny. Kvantifikace mRNA byla prováděna v triplikátech za použití komerčních TaqMan® Gene Expression Assays (Rn99999125_m1, Rn02532082_g1, Rn01536933_m1, Rn00561129_m1, Rn00821037_g1, Rn03993492_g1, Rn00566938_m1) (Applied Biosystems, CA, USA) a byl zvolen rychlý teplotní protokol s použitím TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). K měření byl používán přístroj ABI Prism® 7900 H.T. Sequence Detection systém (Applied Biosystems, CA, USA) a následná analýza 96 jamkových destiček byla provedena přístrojovým softwarem RQ manager 1.2. (Applied Biosystems, CA, USA). Měření probíhala v Transplantační laboratoři IKEM (Ing. Irena Brabcová, PhD.).

Výsledky

A) Zavedení transplantačních modelů

K nácviku odběru a transplantace pankreatikoduodenálního štěpu bylo použito 40 potkanů kmene Lewis. Úspěšné transplantace s dlouhodobým přežíváním příjemců se podařilo dosáhnout zkrácením doby našívání cévních anastomóz, zvládnutím „no-touch“ techniky manipulace se štěpem slinivky a pečlivým perioperačním a pooperačním sledováním, udržováním konstantní tělesné teploty a minimalizací krevních ztrát. Po zdokonalení chirurgické techniky se nám podařilo dosáhnout dlouhodobého přežívání (více než 28 dnů) a dosažení dlouhodobé normoglykémie s normalizací IVGTT u transplantace syngenním diabetickým potkanům kmene Brown-Norway (n=6).

Při nácviku techniky transplantace ledviny jsme řešili problém cévních anastomóz a anastomózy močovodu. Pro snížení rizika žilní trombózy bylo důležité konstruovat široké anastomózy. U tepenné E-E anastomózy jsme použili pokračující steh Prolene 10/0.

Uretero-uretero E-E anastomóza byla nejprve konstruována jednotlivými stehy se stentem, později jsme používali anastomózu bez stentu se stejnými dlouhodobými pooperačními výsledky. Výskyt stenózy nebo leaku z anastomózy jsme při sekcích nepozorovali.

K samotným experimentům jsme přikročili poté, co jsme dosáhli 100% dlouhodobého přežívání zvířat (nad 28 dnů) po transplantaci nekonzervovaných štěpů. Vzhledem k tomu, že všichni příjemci podstoupili nejprve oboustrannou nefrektomii vlastních ledvin, přežívání zvířat a funkce štěpů si v našem modelu plně odpovídají.

Odběr pankreatu pro izolaci Langerhansových ostrůvků se vzhledem k nutnosti konzervace v naší studii lišil od rutinního postupu, kdy je kolagenáza injikována do pankreatického vývodu ještě v těle anestetizovaného zvířete. Při nácviku odběru pankreatu od potkana bylo důležité zachování kapsuly pankreatu a zavedení kanyly do ductus choledochus před následnou konzervací orgánu. Celistvost kapsuly slinivky je důležitá pro optimální plnění pankreatu kolagenózou.

B) Konzervace pomocí TLM zlepšuje přežívání zvířat po transplantaci ledviny

K posouzení vlivu TLM při dlouhodobé konzervaci ledviny jsme sestavili 3 skupiny:

skupina 1 (n=16) - štěp transplantovaný po 24 hod konzervace v UW roztoku při teplotě 4°C,

skupina 2 (n=16) - štěp transplantovaný po 24 hod konzervace pomocí TLM při teplotě 4°C

a skupina 3 (n=12) - kontrolní, s bezprostředně transplantovaným štěpem ledviny.

Manipulační čas našívání cévních anastomóz byl v průměru 24 minut (min-max, 19-29) bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami.

U poloviny transplantovaných v každé skupině (8, 8 a 6, náhodně vybraných) bylo sledováno pouze přežívání. U ostatních zvířat ve skupinách bylo provedeno biochemické vyšetření krve a odběr ledviny k histologickému vyšetření a zhodnocení míry apoptózy 24 hodin po transplantaci. Jelikož byla u všech příjemců ledvin provedena zároveň oboustranná nefrektomie, přežívání příjemců přímo souviselo s přežíváním štěpů.

Všechna zvířata přežila 24 hodin od transplantace. Při sekci nebyly zjištěny chirurgické komplikace jako krvácení, dilatace ureteru, stenózy cévních anastomóz, močový leak. Úmrtí příjemce ledviny v časném pooperačním období probíhalo pod obrazem urémie při

nedostatečné funkci štěpu. Dlouhodobé přežívání (tj. déle než 28 dní) ve skupinách 1, 2 a 3 bylo 12,5%, 62,5% a 100% (pro skupinu 1 vs 2 bylo $p < 0,01$).

C) Konzervace pomocí TLM zlepšuje časnou funkci transplantované ledviny

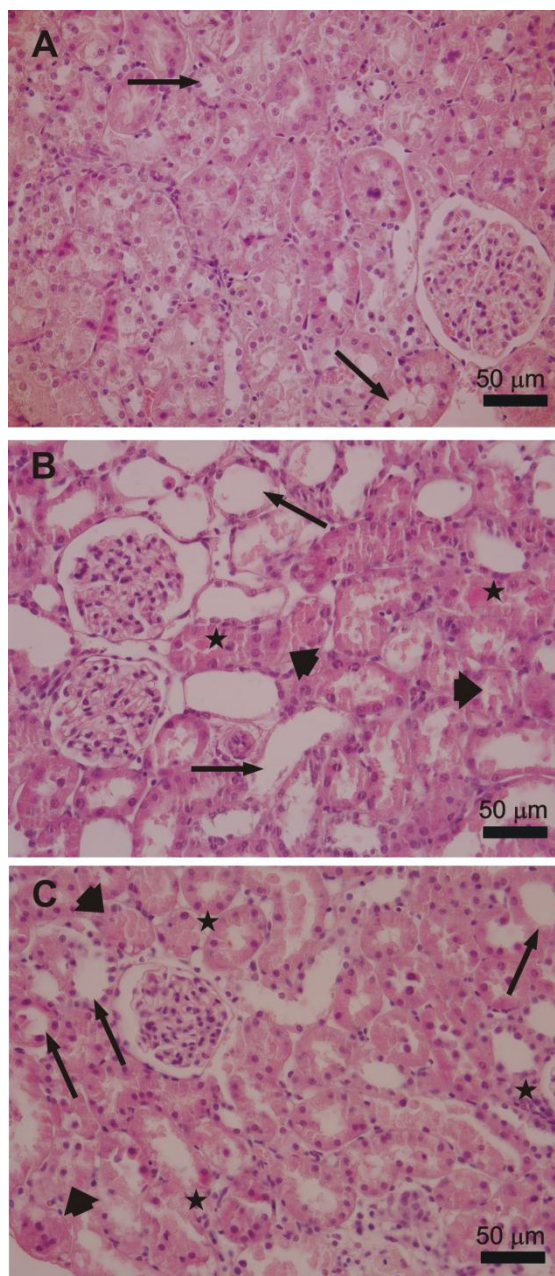
Koncentrace kreatinu v krvi odebrané v i.m. anestezii 7 dní před transplantací kapilárou ze spojivkového vaku potkanů byla bez signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami. Průměrná koncentrace kreatininu v krvi 24 hod po transplantaci byla 381 (292-443), 299 (255-374) a 121 (102-138 $\mu\text{mol/l}$, skupina 1 vs 2 $p < 0,02$). Jak bylo uvedeno výše, vzhledem ke zvolenému modelu odpovídá přežívání zvířat trvání funkce transplantované ledviny a potvrzuje tak lepší orgánovou funkci při použití metody TLM.

D) Konzervace pomocí TLM snižuje rozsah ischemicko-reperfúzního poškození

Polovinu ledviny odebrané 24 hodin po transplantaci jsme zpracovali pro histologické vyšetření. Oproti kontrolní skupině ($n=6$) byl u ledvin ze skupiny 1 (konzervace UW roztokem, $n=8$) a 2 (konzervace pomocí TLM, $n=8$) na histologických preparátech barvených hematoxylinem-eosinem zjištěny známky těžkého poškození tkáně, jako atrofie epiteliálních buněk, intersticiální edém a nekrózy buněk tubulů (Obr. 11). V jednotlivých skupinách jsme hodnotili procento normálních, poškozených a nekrotických tubulů na 25 nepřekrývajících se mikrofotografiích o rozměrech $430 \times 320 \mu\text{m}$ na jednotlivý preparát.

Ischemicko-reperfúzní poškození bylo na hodnocených histologických preparátech výraznější u skupiny 1 oproti skupině 2 ($p < 0,01$). Výsledky ukazuje následující tabulka:

	skupina 1 (UW) (%)		skupina 2 (TLM) (%)			Kontrolní skupina (%)		
Grade	průměr	SEM	průměr	SEM	p (1 vs 2)	průměr	SEM	p (1 vs 2)
1 (normální tubuly)	3,2	0,7	2,7	0,8	0,6 (ns)	80,7	0,9	< 0,01
2 (poškozené tubuly)	30,3	1,9	40	3,2	< 0,05	15,2	0,9	< 0,01
3 (nekrotické tubuly)	66,7	2,1	57,3	3,0	< 0,05	4,1	0,2	< 0,01

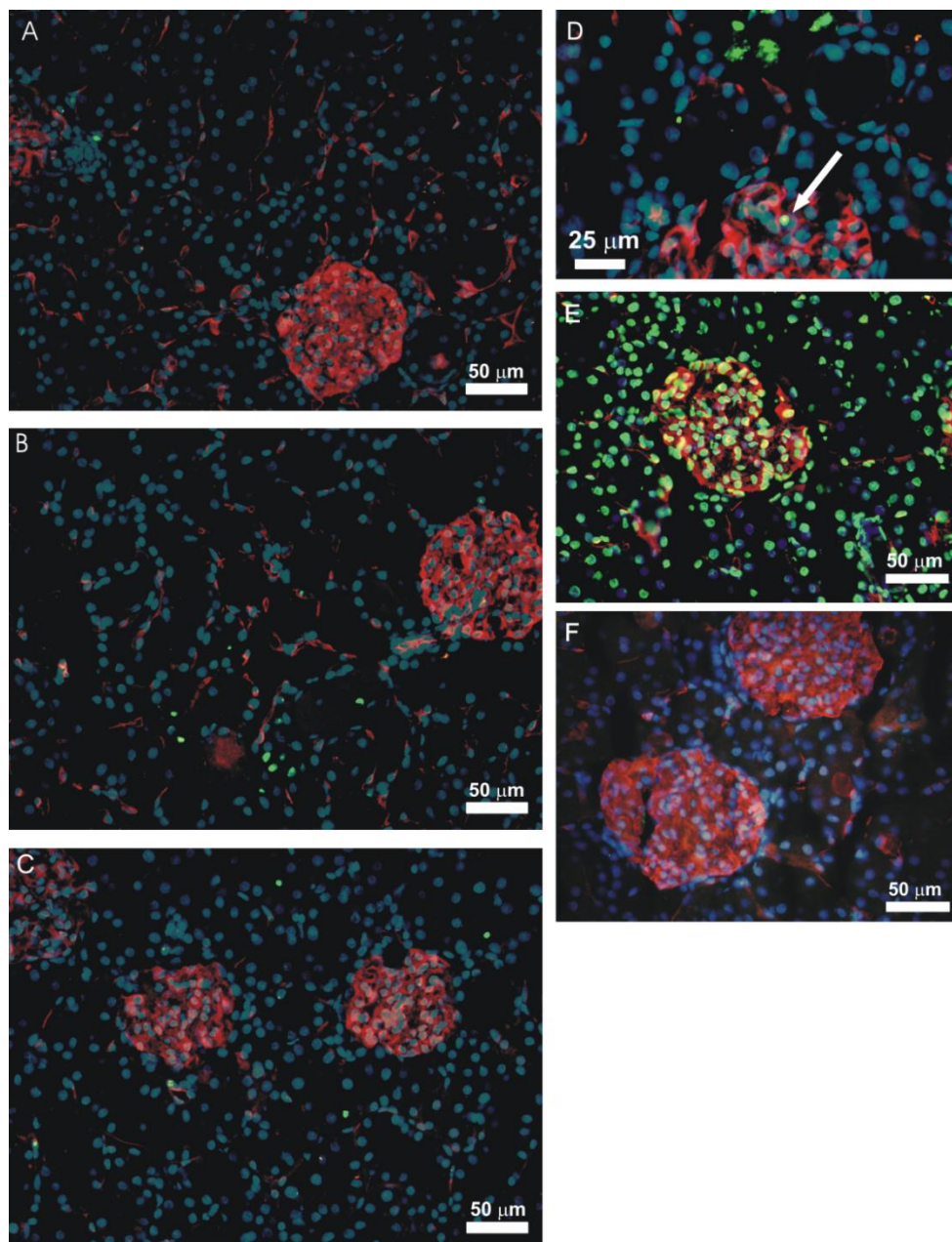


Obr. 11

Histologické preparáty ledvin 24 hodin po transplantaci barvené hematoxylinem-eosinem A: kontrolní skupina (3) bez nekrotických tubulů, pouze s ojedinělým výskytem dilatace tubulů (šipka). B: skupina 1 (UW) s těžkým poškozením tubulů (šipky), nekrózami (tlusté šipky) a hyalinními válci (hvězdička). C: skupina 2 (TLM) s méně vyjádřeným poškozením tubulů, intersticiálním edémem (hvězdička), dilatací tubulů (tenká šipka) a s výskytem jak nekrotických, tak i neporušených tubulů (tlustá šipka).

E) Konzervace pomocí TLM snižuje apoptózu renálních buněk

Míra apoptózy byla hodnocená pomocí metody TUNNEL v buňkách tubulů. Nízký výskyt apoptózy jsme pozorovali ve všech třech skupinách (Obr. 12). Významně vyšší výskyt byl ve skupině 1 (konzervace pomocí UW roztoku) oproti skupině 2 (konzervace pomocí TLM). Průměrně jsme zjistili $12 \pm 1,6$ oproti $5 \pm 0,5$ TUNEL pozitivních buněk na zorné pole; $p < 0,01$). $0,6 \pm 0,2$ TUNEL pozitivních buněk na zorné pole u kontrolní skupiny 3 ($p < 0,001$ oproti oběma dalším skupinám).



Obr. 12

TUNEL assay u štěpu ledviny explantované 24 hodin po transplantaci. Vybrali jsme reprezentativní fotografie preparátů z jednotlivých skupin: A) kontrolní skupina, B) skupina 1 (UW), C) skupina 2 (TLM), D) ojedinělý nález TUNEL pozitivní buňky v glomerulu (šipka), E) pozitivní kontrola, F) negativní kontrola. Na fotografiích jsou patrné TUNEL pozitivní buňky (zelené), glomeruly značené pomocí markeru podocalyxin-like peptide 1 (červené) a buněčná jádra zvýrazněná pomocí DAPI (modrá).

F) Konzervace pankreatu pomocí TLM zvyšuje výtěžnost izolovaných ostrůvků

Po 24-hodinové konzervaci pankreatu v UW roztoku nebo pomocí TLM byla výtěžnost ostrůvků řádově snížena na 1/5 až 1/10 oproti kontrolní skupině bez studené ischemie ($p<0,01$; T-test). Porovnání skupin UW a TLM však ukázalo, že výtěžnost byla významně vyšší ve skupině konzervované pomocí TLM než ve skupině UW ($p<0,01$).

Výsledky výtěžnosti LO v jednotlivých skupinách ukazuje následující tabulka:

skupiny	počet pankreatů	Ø počet izolovaných LO z jednoho pankreatu	SD
skupina 1 (UW)	39	137	111
skupina 2 (TLM)	35	220	108
skupina 3 (kontrola)	10	790	156

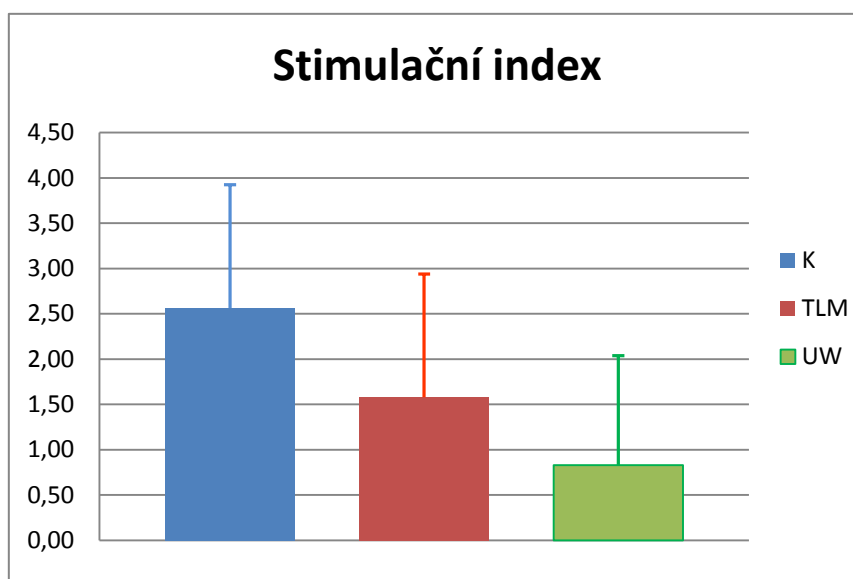
G) Funkce ostrůvků in vitro a in vivo je lepší při použití TLM

Průměrné hodnoty (\pm SD) stimulačních indexů inzulínu získaných při inkubaci Langerhansových ostrůvků izolovaných bezprostředně po odběru pankreatu (kontrolní skupina), po 24-hodinové konzervaci pankreatu v UW roztoku (skupina UW) a po 24-hodinové konzervaci pomocí TLM (skupina TLM) byly:

kontrolní skupina (n=15): SI=2,57 \pm 1,36

skupina UW (n=15): SI=0,83 \pm 1,21

skupina TLM (n=15): SI=1,58 \pm 1,36



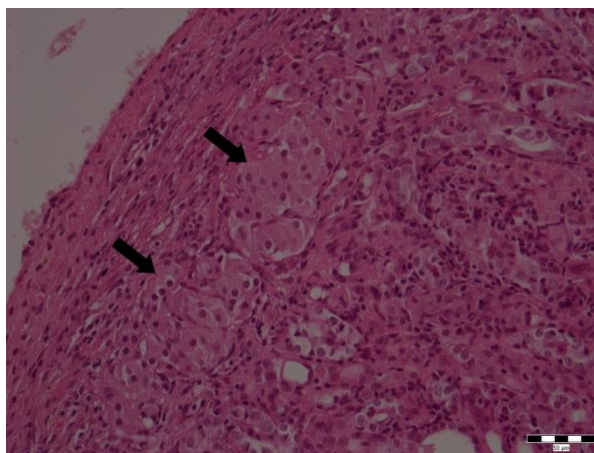
Obr. 13

Hodnoty stimulačního indexu inzulínu izolovaných ostrůvků (poměr hladiny inzulínu v médiu při vysoké a při bazální koncentraci glukózy; průměr a SD)

Porovnání T-testem ukázalo, že ve srovnání s kontrolní skupinou vedla 24-hodinová konzervace v samotném UW roztoku ke zhoršení funkce ostrůvků ($p=0,0084$), zatímco při porovnání s ostrůvky konzervovanými pomocí TLM nebyl rozdíl statisticky významný ($p = 0,093$).

Stanovovali jsme rovněž průměrný obsah inzulínu ve 100 izolovaných ostrůvcích, který činil u skupiny TLM ($n=6$) 5,62 mIU, u skupiny UW ($n=3$) 4,99 mIU a u kontrolních ostrůvků ($n=2$): 5,81 mIU.

Izolované LO byly následně transplantovány diabetickým NuNu myším pod kapsulu levé ledviny. Typický histologický obraz transplantovaných ostrůvků ukazuje obr. 14.



Obr. 14

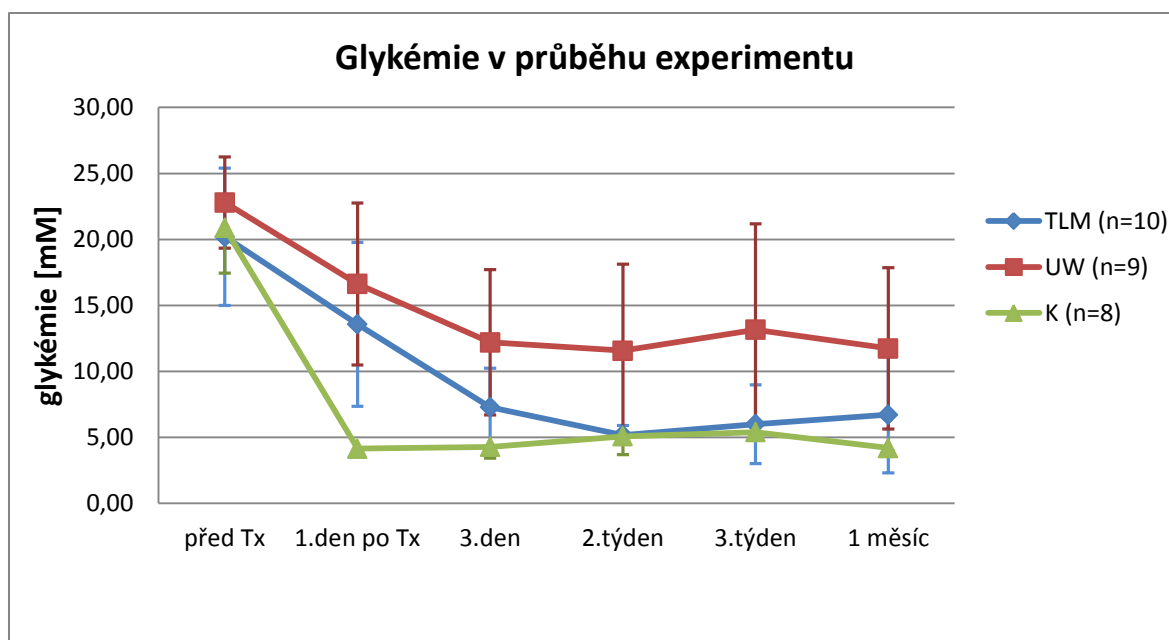
Langerhansovy ostrůvky potkana transplantované pod renální kapsulu athymické myši.
(barvení hematoxylin-eosin)

Hodnotili jsme opět 3 skupiny – skupina 1 po konzervaci v UW roztoku (n=9), skupina 2 po konzervaci pomocí TLM (n=10) a kontrolní skupina 3 (n=8).

Každé myši bylo transplantováno 400 LO. Následně jsme po dobu 8 týdnů hodnotili denně glykémie a ve 2. a 8. týdnu jsme provedli intraperitoneální glukózový toleranční test.

V UW skupině zůstalo diabetických 5 zvířat (glykémie trvale > 9 mmol/l), ve skupině TLM zůstalo diabetické pouze jedno zvíře a ve skupině kontrolní byla trvale diabetická 2 zvířata.

Rozdíl mezi skupinami TLM a UW hodnocený pomocí Mann-Whitneyova testu byl statisticky významný ($p < 0,05$). Průběh glykemií v jednotlivých skupinách je na obr. 15.

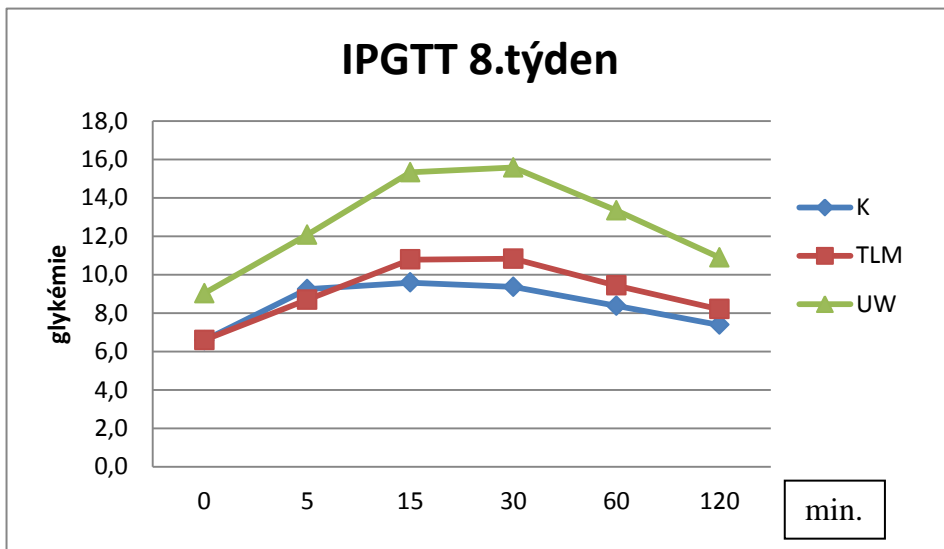
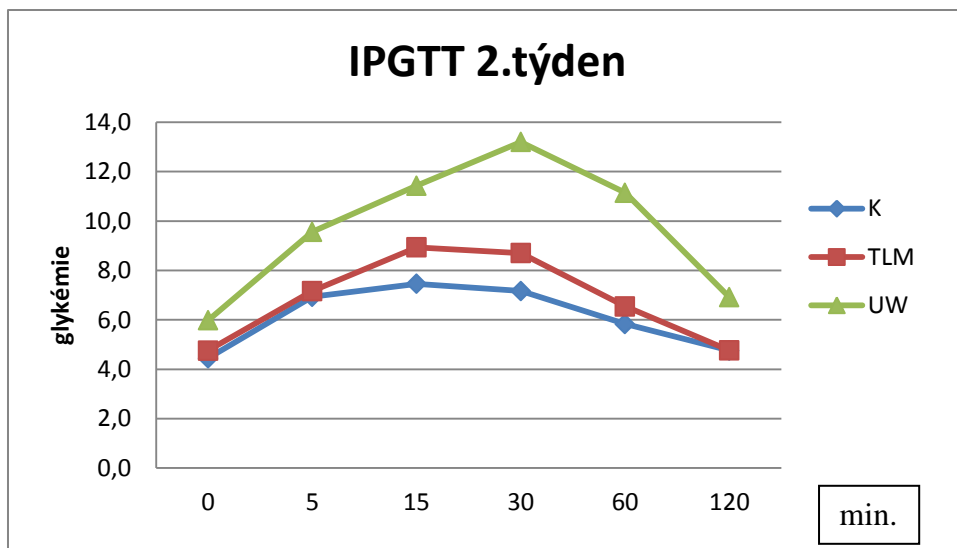


Obr. 15

Průběh glykemií po transplantaci 400 Langerhansových ostrůvků diabetickým athymickým myším (průměrné hodnoty a SD).

Výsledky intraperitoneálních glukózových tolerančních testů ukazuje obr. 16. Je patrné, že při prosté konzervaci pankreatu pomocí UW roztoku jsou glykémie vyšší než při konzervaci pomocí TLM, kdy se výsledky zásadně neliší od hodnot dosažených při použití ostrůvků izolovaných bezprostředně po odběru pankreatu.

Nefrektomie ledviny s transplantovanými ostrůvky 8 týdnů po transplantaci vedla k opětovnému rozvinutí diabetu s glykemiemi nad 18 mmol/l, čímž byl potvrzen výhradní vliv transplantovaných ostrůvku na dosažení normoglykémie.



Obr. 16

Průměrné hodnoty glykemií (mmol/l) během intraperitoneálního glukózového testu provedeného 2. a 8. týden po transplantaci 400 ostrůvků pod renální kapsulu diabetickým myším.

H) Konzervace pomocí PFH snižuje výskyt časných známek ischemicko-reperfuzního poškození transplantovaného pankreatu

K posouzení vlivu PFH při dlouhodobé konzervaci pankreatu jsme sestavili 3 skupiny:

skupina UW (n=8) - štěp transplantovaný po 18 hodinách konzervace v UW roztoku při teplotě 4°C, skupina PFH (n=8) - štěp transplantovaný po 18 hodinách konzervace pomocí PFH při teplotě 4°C a kontrolní skupina 3 (n=8) s bezprostředně transplantovaným štěpem pankreatu.

Manipulační čas našívání cévních anastomóz byl v průměru 26 minut (min-max, 20-34) bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami.

Biochemické vyšetření

Ve vzorcích séra odebraného 2 hodiny po reperfuzi jsme naměřili signifikantně vyšší hodnoty pankreatické amylázy a lipázy v UW skupině ve srovnání se skupinou PFH ($94,2 \pm 25,2$ vs.

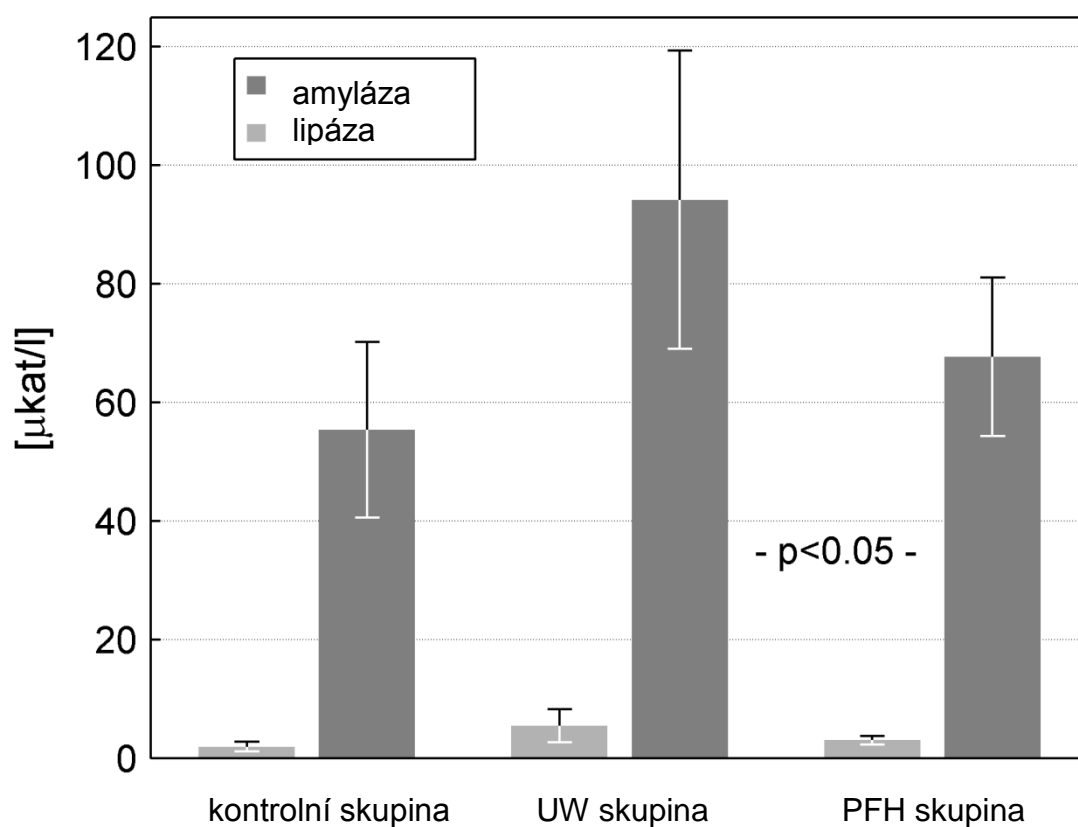
$67,7 \pm 13,4$ $\mu\text{kat/l}$ resp. $5,5 \pm 2,8$ vs. $3 \pm 0,7$ $\mu\text{kat/l}$, $p < 0,05$) - hodnoceno pomocí

Mann-Whitneyova testu. Signifikantní rozdíl jsme pozorovali i mezi kontrolní skupinou a ostatními skupinami ($55,4 \pm 14,8$ resp. $1,9 \pm 0,8$ $\mu\text{kat/l}$, $p < 0,05$) (průměr \pm SD).

Expresí genů

Hodnotili jsme změny v expresi sedmi genů spojených s IR poškozením dvě hodiny po reperfuzi transplantovaného pankreatu konzervovaného po dobu 18 hodin v oxygenovaném PFH nebo studeném UW roztoku a pankreatů transplantovaných bezprostředně po odběru v kontrolní skupině.

Zjistili jsme signifikantní rozdíl mezi skupinami UW a PFH u exprese genů pro TNF β a endothelin 1 ($p < 0,05$). Oba byly více než dvojnásobně exprimovány ve skupině UW. U ostatních genů jsme nezjistili rozdíl v expresi mezi skupinami.



Graf ukazuje průměrnou plazmatickou hladinu amylázy a lipázy ve všech třech experimentálních skupinách. V obou parametrech jsme prokázali signifikantní rozdíl mezi UW a PFH skupinou.

Zkratka genu	Název genu	Expese genu v kontrolní skupině	Expese genu ve skupině UW	Expese genu ve skupině PFH
Bax	Bcl2-asociovaný X protein	0,88	0,80	0,60
Bcl2	B-cell leukaemia/lymphoma 2	1,29	0,68	1,03
Edn1	endotelin 1	2,00	3,33*	1,31*
Hmox1	hemoxxygenáza 1	0,76	0,23	0,30
Hspd1	heat shock protein 1	1,88	2,19	1,53
Lta (TNF β)	lymfotoxin alpha	0,90	0,80*	0,38*
Sod1	superoxiddismutáza 1	1,27	1,33	1,20

Tabulka ukazuje průměrné hodnoty exprese genů v experimentálních skupinách.

Hvězdička (*) označuje signifikantní rozdíl mezi skupinami ($p < 0,05$).

Diskuze

Narůstající počet pacientů čekajících na léčbu transplantací zvyšuje požadavky na množství vhodných kadaverózních orgánů, které je i tak značně omezené. To nás nutí postupně rozšiřovat kritéria ohledně věku a komorbidit dárců, studené i teplé ischemie a dalších rizikových faktorů včetně využití dárců s nebijícím srdcem [33]. Za těchto okolností může být jakékoliv opatření, které předchází vzniku nebo snižuje rozsah ischemicko-reperfučního poškození velký význam. Metoda orgánové konzervace pomocí dvou vrstev (TLM), založená na oxygenaci konzervačního roztoku během studené ischemie se jevila jako užitečná zejména při klinické transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků, ale nestala se zatím součástí rutinních konzervačních postupů. V případě transplantace ledviny nebyla kromě současného projektu testována vůbec. Podařilo se nám prokázat, že TLM snižuje tkáňové poškození vznikající v průběhu prodloužené studené ischemie a tím vede i k lepší bezprostřední funkci experimentálně transplantované ledviny a přežívání příjemců. Potvrdili jsme také dřívější experimentální nálezy, že pomocí TLM je možné dosáhnout vyššího zisku a lepší kvality izolovaných Langerhansových ostrůvků než při použití standardní konzervace pomocí UW roztoku. Na modelu orgánové transplantace pankreatu jsme prokázali protektivní vliv dlouhodobé konzervace pomocí perfluorohexyloctanu, který byl jako nová generace méně lipofilních PFC s lepším průnikem kyslíku do tkání dosud použit pouze ke konzervaci pankreatu před následnou izolací LO [29,34].

Příznivý vliv PFC při konzervaci štěpu ledviny v experimentu na potkanech byl naznačen už v práci Malufa [35], který ale nehodnotil funkci a přežívání štěpů. V našem experimentu byla prováděna transplantace ledviny zvířatům po předchozí bilaterální nefrektomii vlastních ledvin. Zachování funkce štěpu ledviny bylo tak možné posuzovat přímo podle přežívání, protože afunkce štěpu znamenala bezprostřední rozvoj urémie s následným úmrtím zvířete.

Ve srovnání s konzervací UW roztokem metoda TLM zjevně zlepšila 28-denní přežívání (62,5% oproti 12,5%; $p < 0.01$) a vedla k nižším hodnotám kreatininu 24 hodin po transplantaci. Kvantitativní histologické vyšetření ukázalo podstatně nižší stupeň tubulárního poškození a nižší výskyt apoptotických buněk. Přitom jak lepší přežívání, tak nižší stupeň poškození byly bezpochyby navozeny rozdílným způsobem konzervace, protože všechny ostatní experimentální podmínky byly v případě obou konzervačních postupů stejné. Můžeme také vyloučit technické příčiny rozdílů, protože díky pečlivému chirurgickému nácviku bylo přežívání zvířat léčených transplantací s minimální studenou ischemií 100% a histologické vyšetření ukázalo jen minimální tubulární změny. Kromě toho pitva provedená u všech uhynulých zvířat neprokázala žádné zjevné chirurgické komplikace. Naše výsledky proto ukazují, že konzervace ledvin s použitím TLM signifikantně zlepšují výsledky transplantace s prodlouženým časem studené ischemie.

Nižší přežívání a pokročilé poškození ledvin ve skupině s konzervací pouze UW roztokem je možné vysvětlit delším časem ischemie, který jsme zvolili proto, abychom lépe odlišili rozdíly v konzervačních metodách [36]. Jiní autoři, kteří studovali efekt UW roztoku jako standardní metody, provedli zpravidla pouze unilaterální nefrektomii u příjemců. To jim sice umožnilo sledovat morfologii a dynamiku reparativních změn, ale znemožnilo hodnotit nástup funkce.

Překvapil nás poměrně malý výskyt apoptózy, která je považována za důležitý faktor v patogenezi ischemicko-reperfúzního poškození [37]. Úmyslně jsme nefrektomii prováděli až 24 hodin po transplantaci, aby bylo možné markery apoptózy detekovat. I když s použitím TLM byla pozitivita TUNEL eseje podstatně nižší, než při použití UW roztoku

(v průměru \pm SD tj. $5 \pm 0,5$ versus $12 \pm 1,6$ buněk na plochu $430 \times 320 \mu\text{m}$; $p < 0,05$), apoptóza nebyla častá a převažujícím znakem tkáňového poškození byla nekróza.

Je nutné připustit určitá omezení samotného vyšetření TUNEL, které se nyní k průkazu apoptózy standardně používá. Senzitivita a specifita mohou být ovlivněny zpracováním vzorků, čemuž jsme se snažili předejít patřičným ošetřením vzorků, které zahrnovalo mikrovlnnou iradiaci při bazickém pH. Překvapením byla také téměř úplná nepřítomnost apoptotických buněk v glomerulech, které jsme pro lepší identifikaci barvili fluorescenčními protilátkami proti podocalyxine-like proteinu 1. Spolehlivost našeho barvení TUNEL jsme potvrdili vyšetřením pozitivních a negativních kontrol.

Všeobecně se má za to, že účinek oxygenovaného PFC koreluje s parciálním tlakem kyslíku v tkáních a s intracelulární produkcí ATP [38]. V našich studiích jsme tlak kyslíku ve tkáních nesledovali. Nicméně, s ohledem na data publikovaná pro potkaní pankreaty konzervované v oxygenovaném PFC [39] předpokládáme, že by vzhledem k obdobné velikosti mohl být podobný. Samozřejmě je nutné připustit, že v modelu u větších zvířat stejně jako u člověka by mohla být hlubší tkáňová oxygenace obtížná. Průnik kyslíku z oxygenovaného PFC do tkáně pankreatu byl diskutován v několika pracích [40]. Měření v prasečím pankreatu naznačovalo dostatečnou oxygenaci pouze do hloubky asi 15 mm [41], ale na druhé straně pozorování při autotransplantaci psiho pankreatu ukazovala korelaci mezi tkáňovou oxygenací, parciálním tlakem kyslíku ve tkáni, produkcí ATP a funkcí ischemicky poškozeného štěpu [38,42]. Můžeme spekulovat, že rovněž u větších zvířat či lidí by alespoň povrchní průnik kyslíku mohl do určité míry zlepšit ochranu orgánů. Tento efekt by mohl být posílen dalšími modifikacemi metody, jako například použitím ještě více lipofilního typu perfluorocarbonu

(např. perfluorohexyloctanu) s lepším průnikem do tkání a ještě vyšší schopností akumulovat kyslík [43] jako jsme použili u orgánové transplantace pankreatu.

Kromě toho je možné, že udržování koncentrace ATP není jediným pozitivním efektem PFC při konzervaci orgánů [44]. Ačkoliv entuziasmus pro konzervaci pankreatu před izolací Langerhansových ostrůvků, který byl jedním z motivů pro zahájení tohoto projektu, v posledních letech částečně opadl [45], TLM stále zůstává součástí izolačního protokolu v některých centrech a je jí připisován podíl na zlepšující se úspěšnosti [46]. V našich experimentech jsme jednoznačně prokázali, že při dlouhé studené ischemii dosahujeme při konzervaci pankreatu pomocí TLM lepší výtěžnosti ostrůvků, které mají také lepší in vitro a in vivo funkci.

Ačkoliv je PFC podrobně studován z hlediska vlivu na izolaci LO z konzervovaného pankreatu, význam pro orgánovou transplantaci slinivky byl hodnocen spíše okrajově.

V našem experimentu jsme se proto zaměřili i na posouzení významu PFC pro transplantaci pankreatu, u kterého jsme hodnotili známky IR poškození.

IR poškození je dynamický proces vrcholící krátce po reperfuzi [47]. V našem modelu s heterotopickou transplantací pankreatu jsme zvolili interval 2 hodiny po reperfuzi k měření exprese genů prozánětlivých cytokinů a sérových koncentrací enzymů. Podobný postup byl používán i v předchozích experimentech hodnotících následky IR poškození na modelu transplantace pankreatu u potkana [48,49]. Tento interval se ukázal jako vhodný k detekci časných IR změn i jejich intenzity. Zjistili jsme rozdíly v expresi genu pro endotelin 1 a TNF β mezi skupinou s oxygenovaným PFH a UW roztokem, která byla významně nižší ve skupině s PFH.

Endotelin 1 sehrává významnou roli v řadě patofyziologických procesů [50]. Exprese genu pro endotelin 1 je indukována hypoxií [51] prostřednictvím HIF 1 [52]. Tato spojitost koreluje i s našim pozorováním, kdy pankreas konzervovaný v oxygenovaném PFH vykazoval menší míru exprese genu pro endotelin 1. Zvýšená exprese genu pro endotelin 1 je spojována s rozvojem pankreatitidy [53,54]. Souvislost mezi IR poškozením a pankreatitidou štěpu je dobře známá [55]. Pankreatitida štěpu jako následek IR poškození vyskytující se u 17-35% transplantací je častou příčinou poškození štěpu vedoucí k jeho zhoršenému přežívání [56,57]. Menší míru reperfuze pankreatitidy naznačují i významně nižší hladiny amylázy a lipázy v PFH skupině.

Exprese genu pro TNF β je zvýšena v průběhu IR poškození spolu s expresí genu pro endotelin 1 [58], což ukázal i náš experiment. Nižší exprese genu pro TNF β ve skupině s oxygenovaným PFH rovněž naznačuje nižší míru IR poškození ve srovnání se skupinou s UW roztokem.

V současné době existují pochopitelně i jiné přístupy k tkáňové oxygenaci, jako je zejména přístrojová perfuze okysličovanými roztoky [59,60]. Oproti statické metodě konzervace s oxygenovaným PFC jsou ale zatím pořád složité a nákladné pro rutinní použití. Slibné výsledky našich experimentů favorizující použití PFC před UW roztokem při dlouhodobé statické studené konzervaci pankreatu a ledviny u potkana potvrzují zájem, který je tomuto konzervačnímu médiu věnován. Nezbytné je samozřejmě potvrzení výsledků v experimentech na větších zvířatech. Nadějně se v tomto ohledu zdá zejména použití nové generace PFC jako je např. PFH umožňující lepší pronikání kyslíku do tkání [29].

Závěry

V experimentech na syngenních potkanech kmene Brown-Norway se nám podařilo prokázat protektivní vliv oxygenovaného perfluorocarbonu při dlouhodobé konzervaci ledviny a pankreatu. Ve srovnání s konvenční konzervací pomocí UW roztoku vedla konzervace pomocí perfluorocarbonu k významnému snížení ischemicko-reperfuzního poškození a zlepšení funkce transplantované ledviny, pankreatu i Langerhansových ostrůvků.

1. V případě transplantace ledvin se nám podařilo prokázat, že dlouhodobá studená konzervace (24 hodin) pomocí oxygenovaného perfluorodecalinu v kombinaci s UW roztokem (tzv. “two-layer method“ - TLM) oproti konzervaci v samotném UW roztoku významně snižuje výskyt apoptózy, histologických změn odpovídajících ischemicko-reperfuznímu poškození, zlepšuje funkci a přežívání transplantovaných štěpů.
2. V případě transplantace Langerhansových ostrůvků jsme při porovnání dlouhodobé (24 hodin) konzervace pankreatu v UW roztoku a pomocí TLM zaznamenali významně vyšší výtěžnost Langerhansových ostrůvků v případě TLM. Konzervace pomocí TLM zlepšovala také in-vitro a in-vivo funkci Langerhansových ostrůvků hodnocenou pomocí stimulačních indexů a glukózových tolerančních testů u atymických NuNu myši s ostrůvky transplantovanými pod renální kapsulu.
3. Na modelu heterotopické transplantace pankreatu jsme při porovnání dlouhodobé (18 hodin) konzervace pomocí perfluorohexyloctanu (PFH) a UW roztoku prokázali významně nižší expresi prozánětlivých genů (endotelin 1 a TNF β) ve tkáni

transplantovaného pankreatu a nižší sérové koncentrace pankreatické amylázy a lipázy u příjemců pankreatu v případě PFH svědčící pro menší míru ischemicko-reperfuzního poškození štěpů.

Použitá literatura

1. Böhmová R, Viklický O. Renal ischemia-reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001;46:267-76.
2. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995;46:235-47.
3. Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: The future of organ preservation revisited? *Cryobiology* 2007;54:129.
4. Lowe KC, Davey MR, Power JB. Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol*. 1998;16:272-7.
5. Matsumoto S, Kuroda Y, Hamano M, et al. Direct evidence of pancreatic tissue oxygenation during preservation by the two-layer method. *Transplantation*. 1996;62:1667-70.
6. Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, et al. Successful extended preservation of ischemically damaged pancreas by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 1993;56:1087-90.
7. Kuroda Y, Matsumoto S, Fujita H, et al. Resuscitation of ischemically damaged pancreas during short-term preservation at 20 degrees C by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method. *Transplantation*. 1996;61:28-30.
8. Matsumoto S, Rigley TH, Qualley SA, et al. Efficacy of the oxygen-charged static two-layer method for short-term pancreas preservation and islet isolation from nonhuman primate and human pancreata. *Cell Transplant*. 2002;11:769-77.
9. Goto T, Tanioka Y, Sakai T, et al. Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation*. 2007;83:754-8.
10. Ricordi C, Fraker C, Szust J, et al. Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation*. 2003;75:1524-7.

11. Kuroda Y, Fujino Y, Kawamura T, et al. Excellence of perfluorochemical with simple oxygen bubbling as a preservation medium for simple cold storage of canine pancreas. *Transplantation*. 1990;49:648-50.
12. Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, et al. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 1991;51:1133-5.
13. Matsumoto S, Sweet I, Strong DM, et al. Additional short-term (5 hours) preservation of pancreas by two-layer (UW solution/perfluorocarbon + oxygen) method prior to islet isolation improved quantity and quality of isolated non-human primate islets. *Am J Transplant* 2001;1(suppl):321.
14. Matsumoto S, Qualley SA, Goel S, et al. Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation*. 2002;74:1414-9.
15. Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, et al. Impact of pancreatic cold preservation on rat islet recovery and function. *Transplantation*. 2009;87:1442-50.
16. Kuroda Y, Kawamura T, Tanioka Y, et al. Heart preservation using a cavitary two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation*. 1995;59:699-701.
17. Tsujimura T, Suzuki Y, Takahashi T, et al. Successful 24-h preservation of canine small bowel using the cavitary two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Am J Transplant*. 2002;2:420-4.
18. Odaira M, Aoki T, Miyamoto Y, et al. Cold preservation of the liver with oxygenation by a two-layer method. *J Surg Res*. 2009;152:209-17.
19. Loehe F, Mueller C, Bittmann I, et al. Influence of long-term preservation with endobronchially administered perfluorodecalin on pulmonary graft function. *Transplantation*. 2000;70:1417-24.

20. Tanioka Y, Sutherland DE, Kuroda Y, et al. Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery*. 1997;122:435-41
21. Matsumoto S, Kandaswamy R, Sutherland DE, et al. Clinical application of the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation before transplantation. *Transplantation*. 2000;70:771-4.
22. Tsujimura T, Kuroda Y, Avila JG, et al. Influence of pancreas preservation on human islet isolation outcomes: impact of the two-layer method. *Transplantation*. 2004;78:96-100.
23. Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation*. 2010;89:1169-75.
24. Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, et al. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation*. 1988;46:457-60.
25. Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation*. 2002;74:1804-9.
26. Hiraoka K, Kuroda Y, Suzuki Y, et al. Outcomes in clinical pancreas transplantation with the two-layer cold storage method versus simple storage in University of Wisconsin solution. *Transplant Proc*. 2002;34:2688-9.
27. Clark LC Jr, Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 1966;152:1755.
28. Peyman GA, Schulman JA, Sullivan B. Perfluorocarbon liquids in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 1995;39:375-95.
29. Brandhorst H, Asif S, Andersson K, et al. A new oxygen carrier for improved long-term storage of human pancreata before islet isolation. *Transplantation* 2010;89:155.
30. Hiraoka K, Trexler A, Eckman E, et al. Successful pancreas preservation before islet isolation by the simplified two-layer cold storage method. *Transplant Proc* 2001;33:952.

31. Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall CS, Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 1983;35:198–204.
32. Lee S, Scott M, de Macedo AR. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. A technique update. *Transplantation* 1986;42:327.
33. Potter SR: Expanded criteria donor kidneys: evolution and current practice. *Nephrol News Issues* 2007;21:52,54,56.
34. Brandhorst H, Iken M, Scott WE, et al. Quality of isolated pig islets is improved using perfluorohexyloctane for pancreas storage in a split lobe model. *Cell Transplant* 2012 [Epub ahead of print]
35. Maluf DG, Mas VR, Yanek K, et al. Molecular markers in stored kidneys using perfluorocarbon-based preservation solution: preliminary results. *Transplant Proc.* 2006;38:1243-6.
36. Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Peart J, et al. Impact of organ preservation using HTK for graft flush and subsequent storage in UW in rat kidney transplantation. *Eur Surg Res.* 2006;38:388-98.
37. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV: Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998;66:872-876.
38. Matsumoto S, Kuroda Y, Fujita H, et al. Resuscitation of ischemically damaged pancreas by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) mild hypothermic storage method. *World J Surg* 1996;20:1030-1034.
39. Matsuda T, Suzuki Y, Tanioka Y, et al. Pancreas preservation by the 2-layer cold storage method before islet isolation protects isolated islets against apoptosis through the mitochondrial pathway. *Surgery* 2003;134:437-45.
40. Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Papas KK. The rat pancreas is not an appropriate model for testing the preservation of the human pancreas with the two-layer method. *Transplantation* 2006;81:1471-1472.

41. Papas KK, Hering BJ, Guenther L, et al. Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplant Proc* 2005;37:3501-3504.
42. Kim Y, Kuroda Y, Tanioka Y, et al. Recovery of adenosine triphosphate tissue levels of grafts preserved by the two-layer method after reperfusion. *Artif Organs*. 1996;20:1120-4.
43. Brandhorst H, Theisinger B, Yamaya H, et al: Perfluorohexyloctane improves long-term storage of rat pancreata for subsequent islet isolation. *Transpl Int* 2009;22:1017-22.
44. Agrawal A, Gurusamy K, Powis S, et al. A meta-analysis of the impact of the two-layer method of preservation on human pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* 2008;17:1315-1322.
45. Caballero-Corbalán J, Eich T, Lundgren T, et al.: No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2007;84:864-869.
46. Kin T, Mirbolooki M, Salehi P, et al.: Islet isolation and transplantation outcomes of pancreas preserved with University of Wisconsin solution versus two-layer method using preoxygenated perfluorocarbon. *Transplantation* 2006;82:1286-1290.
47. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190:255-66.
48. Drognitz O, Michel P, Koczan D, et al. Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation. *Transplantation* 2006;81:1428.
49. Preissler G, Massberg S, Eichhorn ME, et al. Islets of Langerhans are protected from inflammatory cell recruitment during reperfusion of rat pancreas grafts. *Eur Surg Res* 2010;44:192.
50. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, et al. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 2011;25:16.
51. Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, et al. Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:973.

52. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:894.
53. Oz HS, Lu Y, Vera-Portocarrero LP, et al. Gene expression profiling and endothelin in acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18:4257.
54. Zhang XP, Zhang J, Ma ML, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010;9:83.
55. Benz S, Bergt S, Obermaier R, et al. Impairment of microcirculation in the early reperfusion period predicts the degree of graft pancreatitis in clinical pancreas transplantation. *Transplantation* 2001;71:759.
56. Fernandez-Cruz L, Sabater L, Gilabert R, et al. Native and graft pancreatitis following combined pancreas-renal transplantation. *Br J Surg* 1993;80:1429.
57. Stratta RJ, Taylor RJ, Lowell JA, et al. Selective use of Sandostatin in vascularized pancreas transplantation. *Am J Surg* 1993;166:598.
58. Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997;48:675.
59. Maathuis MH, Manekeller S, van der Plaats A, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg* 2007;246:982-8.
60. Doorschodt BM, Schreinemachers MC, Florquin S. Evaluation of a novel system for hypothermic oxygenated pulsatile perfusion preservation. *Int J Artif Organs*. 2009;32:728-38.

Seznam publikací

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact factorem

Marada T, Zacharovova K, Saudek F. Perfluorocarbon improves post-transplant survival and early kidney function following prolonged cold ischemia. *Eur Surg Res.* 2010;44:170-8.

(**IF 1,5**)

Marada T, Zacharovova K, Brabcova I, Fabryova E. Gene Expression Changes in Rat Pancreas Transplant Model after Graft Long-Term Cold Storage in Perfluorohexyloctane. *Transplantation Proceedings* 2013 (in the press) (**IF 1,0**)

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s impact factorem

Matia I, Janousek L, **Marada T**, Adamec M. Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;34:424-31. (**IF 2,8**)

b) bez impact faktoru

Marada T, Lipar K, Adamec M, Girman P, Kriz J, Saudek F. [Simultaneous transplantation of the kidney and the islets of Langerhans]. *Rozhl Chir.* 2011;90:111-3.

Janousek L, **Marada T**, Chlupac J, Lipar K, Balaz P, Rokosny S, Matia I, Adamec M.

[Eversion carotid endarterectomy: evaluation of results after changing the operation technique]. Cas Lek Cesk. 2011;150:41-3.

Matia I, Adamec M, Janousek L, Lipar K, **Marada T**, Klein D, Balaz P, Varga M, Chlupac J, Rokosny S. Clinical experience with cold-preservation of venous and arterial allografts. long-term outcomes. Rozhl Chir. 2010;89:45-5.

Seznam příloh

Příloha A

Marada T, Zacharovova K, Saudek F. Perfluorocarbon improves post-transplant survival and early kidney function following prolonged cold ischemia. Eur Surg Res. 2010;44:170-8.

(IF 1,5)

Příloha B

Marada T, Zacharovova K, Brabcova I, Fabryova E. Gene Expression Changes in Rat Pancreas Transplant Model after Graft Long-Term Cold Storage in Perfluorohexyloctane. Transplantation Proceedings 2013 (in the press) (IF 1,0)

Příloha A

Perfluorocarbon improves post-transplant survival and early kidney function following prolonged cold ischemia.

Marada T, Zacharovova K, Saudek F.

European Surgical Research

2010, vol. 44, no. 3-4, p. 170-178

Perfluorocarbon Improves Post-Transplant Survival and Early Kidney Function following Prolonged Cold Ischemia

T. Marada K. Zacharovova F. Saudek

Department of Transplant Surgery and Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Key Words

Ischemia-reperfusion injury · Perfluorocarbon · Preservation methods · Rat model · Renal transplantation

Abstract

Background: The two-layer organ preservation method (TLM) based on oxygenated perfluorocarbon overlaid with University of Wisconsin (UW) solution has been successfully used in clinical islet and experimental heart and intestine transplantation. We tested whether this technique would prevent tissue damage and improve kidney function in a model of syngeneic kidney transplantation with prolonged ischemia time. **Methods:** Kidneys were stored for 24 h either in UW solution (n = 16), with TLM (n = 16) or transplanted immediately (control group, n = 12). In half of the animals, survival was observed and in the other animals grafts were procured for semiquantitative histological scoring and TUNEL apoptosis assessment 24 h after transplantation. **Results:** One-month survival rates in the UW, TLM and control groups were 12.5, 62.5 and 100%, respectively (UW vs. TLM, $p < 0.01$). Median creatinine levels 24 h after transplantation were 381, 299 and 121 μM , respectively (UW vs. TLM, $p < 0.02$). Histological scoring showed more severe tissue damage in the UW group than in the TLM group ($p < 0.05$). Apoptosis was more frequent in the UW group than in the TLM group ($p <$

0.05). **Conclusion:** We demonstrated for the first time that conservation with TLM significantly improves the outcome of kidney transplantation in a rat model and should therefore be further studied in larger animals.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

The main principle of cold static organ storage is based on the assumption that rapid cooling to near 0°C will result in complete cessation of cellular metabolism. At normal temperature, lack of oxygen would lead to an immediate fall in adenosine triphosphate (ATP) levels, disruption of cellular membrane functions and accumulation of harmful products of anaerobic metabolism with irreversible sequels. It has been estimated that cooling from 37 to 0°C reduces cellular metabolism by a factor of 12 but does not stop it completely [1]. This leads to a gradual depletion of adenosine diphosphate and ATP as the major sources of energy for the cells, while mitochondrial ATP regeneration is impaired due to hypoxia and low temperature [2]. Therefore, in 1988 Kuroda et al. [3] suggested to use oxygenated perfluorocarbon (PFC) as an oxygen-supplying agent during cold ischemia. In this so-called two-layer method (TLM), dog pancreata flushed by Eurocollins

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
0014-312X/10/0444-0170\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/esr

Prof. Frantisek Saudek, MD, PhD
IKEM, Videňská 1958/9
CZ-140 21 Prague 4 (Czech Republic)
Tel. +420 26136 4107, Fax +420 26136 2820
E-Mail frantisek.saudek@ikem.cz

solution were successfully stored for up to 48 h at 4°C floating between layers of oxygenated PFC (with higher specific gravity) and conventional storage solution. Kuroda et al. [4] replaced Eurocollins solution by University of Wisconsin (UW) solution which contains adenosine and reported a higher ATP production rate in pancreatic tissue stored using the TLM. Consequently, the TLM was reported to achieve better organ function in experimental pancreas [5, 6], heart [7] and intestinal transplantation [8] and to rescue the graft in a model of prolonged warm ischemia time [9]. Higher pancreatic islet yield and better function has been found by several research groups in comparison with conventional UW pancreas storage in experimental [10–12], as well as in clinical studies [13, 14], though this effect has not been confirmed in a larger series [15–17]. The TLM for pancreas transplantation has therefore become a standard procedure in several centers supposedly enabling to prolong the cold ischemia time before islet isolation [18–21].

The current organ shortage consistently leads to expansion of donor selection criteria and consequently to higher demands on preservation techniques. Low cell oxygen supply during cold storage is supposed to be a major factor causing tissue injury by multiple mechanisms with subsequent organ failure or delayed graft function in kidney transplantation [22]. Maluf et al. [23] submitted preliminary *in vitro* data that TLM preservation of rat kidneys upregulated heme oxygenase 1 and downregulated inducible nitric oxide synthase expression profiles suggesting a cytoprotective effect. Reznik et al. [24] briefly reported better initial function of marginal kidney grafts which had initially been perfused with cold PFC emulsion. However, the technique of oxygenation with PFC or a similar substance during static cold preservation has not been studied in kidney transplantation. The aim of our study was to assess whether the TLM storage would result in better short-term animal and graft survival and prevent hypoxia-reperfusion injury in a rat model of kidney transplantation with a long cold ischemia time.

Materials and Methods

Animals

Adult inbred male Brown-Norway rats (250–310 g, Charles River, Germany) were used as donors and recipients for syngeneic kidney transplantation. The animals were housed for more than 1 week before surgery in a temperature-controlled (23°C) room with a 12-hour light/12-hour dark cycle and free access to water and rodent chow.

All experiments were approved by the local Animal Care and Use Committee and complied with the animal care protection law of the Czech Republic and with 'Principles of Laboratory Animal Care' (NIH publication, vol. 25, No. 28, revised 1996).

Experimental Groups

Before transplantation the animals were randomly allocated into 3 groups to study post-transplant survival and kidney histology. The donor left kidney was recovered and stored for 24 h in UW solution (UW group, $n = 16$), for 24 h with the use of TLM (TLM group, $n = 16$) or transplanted immediately without any cold storage (control group, $n = 12$). Before transplantation, bilateral nephrectomy was performed in all animals.

In half of the animals of each group, serum creatinine was measured and graft nephrectomy was performed 24 h after transplantation (8, 8 and 6 animals in the UW group, TLM group and control group, respectively). Post-transplant survival was followed for 28 days in the remaining animals. Since bilateral nephrectomy had been performed in all recipients, animal survival corresponded to graft survival.

Kidney Transplantation

All microsurgical procedures were performed under a microscope with $\times 2.5$ –5 magnification by the same surgeon (T.M.). The animals were placed in the supine position on a heated pad to maintain constant body temperature between 36 and 37°C during the operation. Donors and recipients were anesthetized by intramuscular injection of ketamine (10 mg/100 g; Narkamon, Spofa, Prague, Czech Republic) and xylazine (1.5 mg/100 g; Rometar, Spofa). The abdomen was entered via a midline incision from the processus xiphoideus to the pelvis. After mobilization of the left kidney, renal vessels were clamped and dissected close to the aorta and vena cava. The ureter was transected above the bladder. The kidney was placed on cold wet gauze and flushed immediately with 3 ml of cold saline and 100 IU of heparin via the renal artery. Except for the control group, the kidneys were also flushed with 2 ml of cold UW solution. For the subsequent 24 h, the organs were either simply stored in UW solution or with the use of the TLM according to the group assignment. After recipient bilateral nephrectomy, the kidney was transplanted orthotopically with end-to-end vascular anastomoses performed using a 10-0 suture for the artery and a 9-0 suture for the vein. The ureter was connected end-to-end with a 10-0 suture without stenting according to Pahlavan et al. [25]. All anastomoses were sewn manually with a mean manipulation time of 24 min (range 19–29 min) without significant differences between the groups. The abdomen was closed after subcutaneous and intraperitoneal administration of 5 ml normal saline. Free access to food and water was provided to all animals.

Preservation Methods

Kidneys were stored in 20 ml of UW solution at 0–4°C for 24 h in the UW group and with a simplified TLM as described by Hiraoka et al. [11] in the TLM group. PFC (perfluorodecalin, F2 Chemicals Limited, UK) was saturated with 100% oxygen 20 min before preservation. The kidney was then fixed at the interface of the PFC and the UW solution layers in a specially designed chamber (fig. 1).

Serum creatinine was measured 7 days before and 24 h after transplantation.



Color version available online

Fig. 1. The preserved kidney is fixed at the interface of PFC and UW solution in a specially designed biologically inert chamber.

Histology

One half of the explanted kidney was fixed in 4% formalin, embedded in paraffin and cut into 5- μ m-thick sections. Light microscopy was used to assess morphological changes in tubular epithelium in hematoxylin-and-eosin-stained sections. The glomeruli did not show relevant signs of ischemia-reperfusion injury and were not evaluated. Histological damage in the cortex was scored semiquantitatively on 25 random nonoverlapping microphotos per sample taken by an Olympus DP71 digital camera with an objective magnification of $\times 40$ and with a displayed microphoto field of $430 \times 320 \mu\text{m}$. The evaluation of all photos was done independently by 2 operators (K.Z. and T.M.) without knowledge of the group assignment of the animal. We quantitatively assessed the intensity of tubular damage in individual microphotos. Grades of tubular damage were established according to Jablonski et al. [26]. An almost normal pattern was assessed as grade 1, epithelial cell atrophy, basement membrane thickening and interstitial edema as grade 2, and proximal tubule damage, nucleus destruction and tubular cell desquamation as grade 3. The percentage of cells of each grade of injury was determined.

TUNEL Assay in Combination with Immunofluorescence Staining of Glomeruli

The explanted kidneys were processed for glomeruli immunostaining followed by apoptosis detection by the TUNEL method. The tissue was fixed in Bouin's solution, washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose, embedded in O.C.T. Compound/Tissue-Tek (Sakura Finetek) and frozen. Cryosections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma). The sections were pretreated in Tris-HCl (0.05 M, pH 10) using a microwave oven. The glomeruli were detected by immunofluorescence staining with rabbit anti-podocalyxin-like protein 1 antibody (Santa Cruise Biotechnology, Inc.) followed by incubation with donkey anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 555 (Invitrogen,

Molecular Probes). TUNEL labeling was performed with the in situ cell death detection kit, fluorescein (Roche). The sections were incubated with the mixture of enzyme and label solutions for 1 h at 37°C . The enzymatic reaction was stopped with 2 saline-sodium citrate buffer (Sigma). Sections were counterstained with Dapi (Fluka) and mounted in Dabco-Mowiol solution in glycerol. TUNEL-positive controls were obtained by incubating tissue with 6 U/ml DNase I recombinant (Roche) in 50 mM Tris-HCl with 1 mM MgCl and 1 mg/ml bovine serum albumin for 10 min at 37°C . Negative controls were prepared by omitting the enzyme solution.

Ten microphotos of the sections were randomly taken by an Olympus BX41 fluorescence microscope equipped with an Olympus DP71 digital camera with an objective magnification of $\times 40$. Apoptotic tubular and glomerular cells were counted separately in each photo.

Statistical Analysis

Data were expressed as median (range) or mean \pm SEM. Differences between groups were assessed by the Mann-Whitney U test. Differences between groups in histology and TUNEL assay were counted per animal. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and the curves were compared by the log-rank test. The differences were considered significant at a p level < 0.05 .

Results

Survival

Twenty-eight-day survival curves of the animals are shown in figure 2. All animals survived 24 h after surgery and as no signs of surgical complications such as bleeding, ureter dilatation, urinary leak or infection were found on section, uremia was considered to be the primary cause of death in that which later died. While the 28-day survival in the control group was 100%, in the UW and TLM groups it was only 12.5 and 62.5%, respectively (UW group vs. TLM group, $p < 0.01$). Most of the animals in the UW group died 24–48 h after surgery and did not produce any urine.

Creatinine Levels

There were no significant differences between the UW, TLM and control groups in serum creatinine levels 7 days before transplantation. The median 24-hour post-transplant serum creatinine levels are shown in figure 3. The difference between the UW and TLM groups 24 h after transplantation was statistically significant (median value 381 vs. 299 μM ; $p < 0.02$, Mann-Whitney U test).

Histology

In contrast to the control group, all kidney grafts in the UW and TLM groups explanted 24 h after transplan-

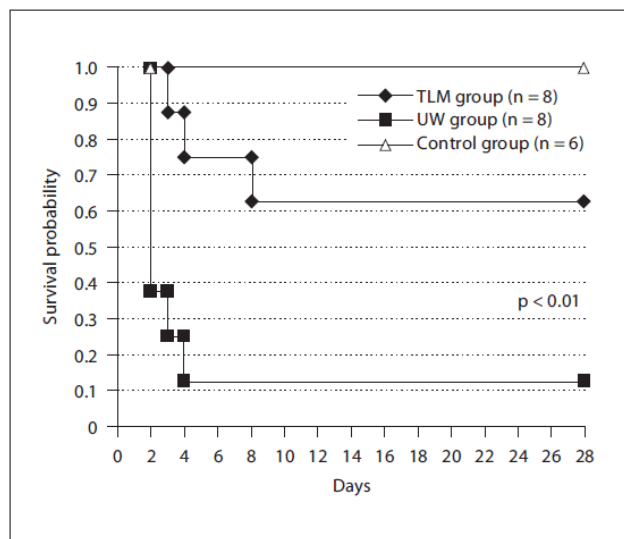


Fig. 2. Cumulative recipient survival rates. Survival is significantly better in the TLM group than in the UW group ($p < 0.01$).

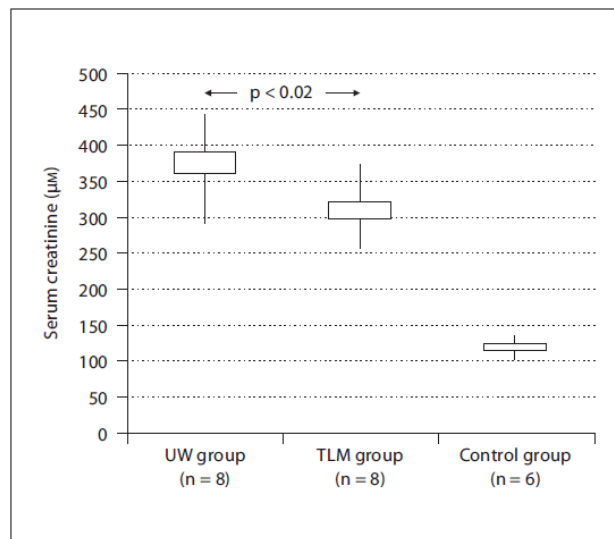


Fig. 3. Serum creatinine 24 h after transplantation (mean level \pm SEM and range). Comparison between the TLM and UW group using the Mann-Whitney U test.

Table 1. Qualitative assessment of tissue damage in renal tubules using a 3-grade scale

Grade	UW group		TLM group		p (UW group vs. TLM group)	Control group		p (controls vs. UW group or TLM group)
	mean	SEM	mean	SEM		mean	SEM	
1 (normal tubules)	3.2	0.7	2.7	0.8	0.6 (n.s.)	80.7	0.9	<0.01
2 (impaired tubules)	30.3	1.9	40	3.2	<0.05	15.2	0.9	<0.01
3 (damaged tubules)	66.7	2.1	57.3	3.0	<0.05	4.1	0.2	<0.01

The rate of individual grades in tissue samples is expressed as a percentage.

tation showed severe signs of tissue injury: epithelial cell atrophy, dilatation of tubules, interstitial edema, tubular cell necrosis, protein casts in the lumen of tubules and large spaces due to tubular cell damage (fig. 4). In general, the extent of disuse damage was more advanced in the UW group than in the TLM group. The results of the histological grading are shown in table 1. There were significant differences in the percentage of normal, impaired and damaged tubules. Representation of impaired tubules (grade 2) was larger in the TLM group than in the UW group (mean \pm SEM 40 \pm 3.2 vs. 30.3 \pm 1.9%; $p < 0.05$). On the contrary, grade 3 (damaged tubules) was more frequently found in the UW group than in the TLM group (66.7 \pm 2.1 vs. 57.3 \pm 3%; $p < 0.05$). In the control

group, the percentages of grade 1, grade 2 and grade 3 tubules were 80.7 \pm 0.9, 15.2 \pm 0.9 and 4.1 \pm 0.2%, respectively, which was significantly better than in both other groups ($p < 0.01$).

TUNEL Assay

We observed a low frequency of apoptosis of kidney cells in all three groups (fig. 5). At the scanned tissue area of 430 \times 320 μ m, there was on average 1 glomerulus detected in all three groups. The mean number of TUNEL-positive cells in glomeruli was neglectable regardless of the kidney preservation method (UW group, TLM group and control group: 0.05, 0.01 and 0.06). Apoptotic cells were found almost exclusively in the tubular tissue. A

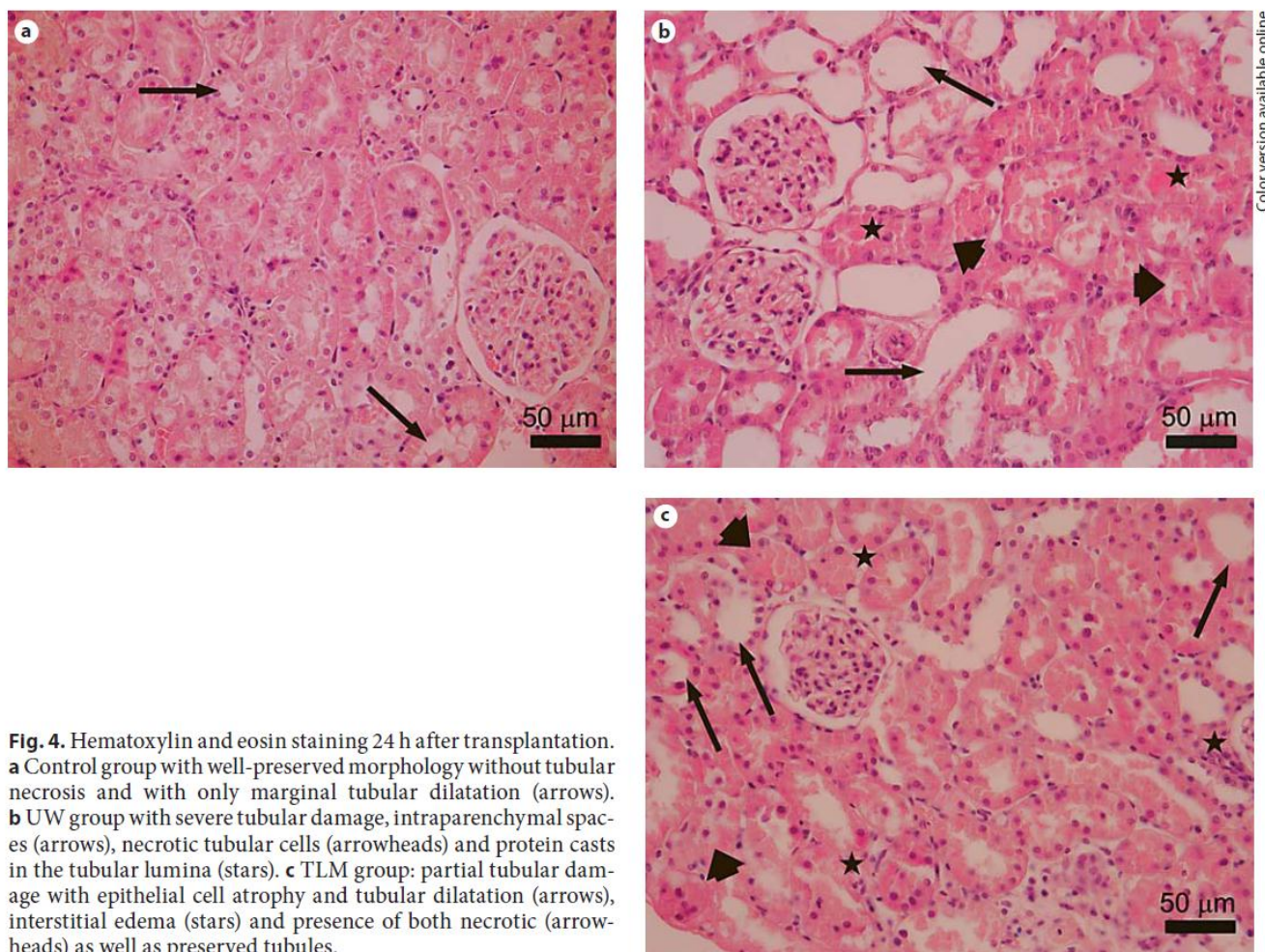


Fig. 4. Hematoxylin and eosin staining 24 h after transplantation. **a** Control group with well-preserved morphology without tubular necrosis and with only marginal tubular dilatation (arrows). **b** UW group with severe tubular damage, intraparenchymal spaces (arrows), necrotic tubular cells (arrowheads) and protein casts in the tubular lumina (stars). **c** TLM group: partial tubular damage with epithelial cell atrophy and tubular dilatation (arrows), interstitial edema (stars) and presence of both necrotic (arrowheads) as well as preserved tubules.

higher number of apoptotic cells per photo was detected in the UW group than in the TLM group (mean \pm SEM 12 ± 1.6 vs. 5 ± 0.5 TUNEL-positive cells per micro-photo; $p < 0.05$); 0.6 ± 0.2 TUNEL-positive cells per photo were found in the control group ($p < 0.01$ vs. both other groups) (fig. 6).

Discussion

The growing number of patients waiting for kidney transplantation places increasing demands on an already limited supply of suitable cadaveric organs. The criteria for acceptable donors have therefore been expanding in terms of donor age, pretransplant diabetes, hypertension, cold ischemia time and other risk factors [27, 28] includ-

ing the reintroduction of organ procurement from donors after cardiac death [29]. Under these circumstances, any factor that may help to prevent or ameliorate ischemia-reperfusion injury would be of great importance. The TLM, based on oxygenation of the preservation solution during the cold ischemia time, showed promise in clinical pancreas and islet transplantation and in experimental heart and intestinal transplantation. In the current study, we therefore tested, whether this technique would be able to mitigate tissue injury and improve survival in a kidney transplant model with a prolonged cold ischemia time.

In our model, the extent of the ischemia-reperfusion injury was rather advanced and as in the recipients bilateral nephrectomy had been performed, post-transplant animal survival correlated with the immediate graft

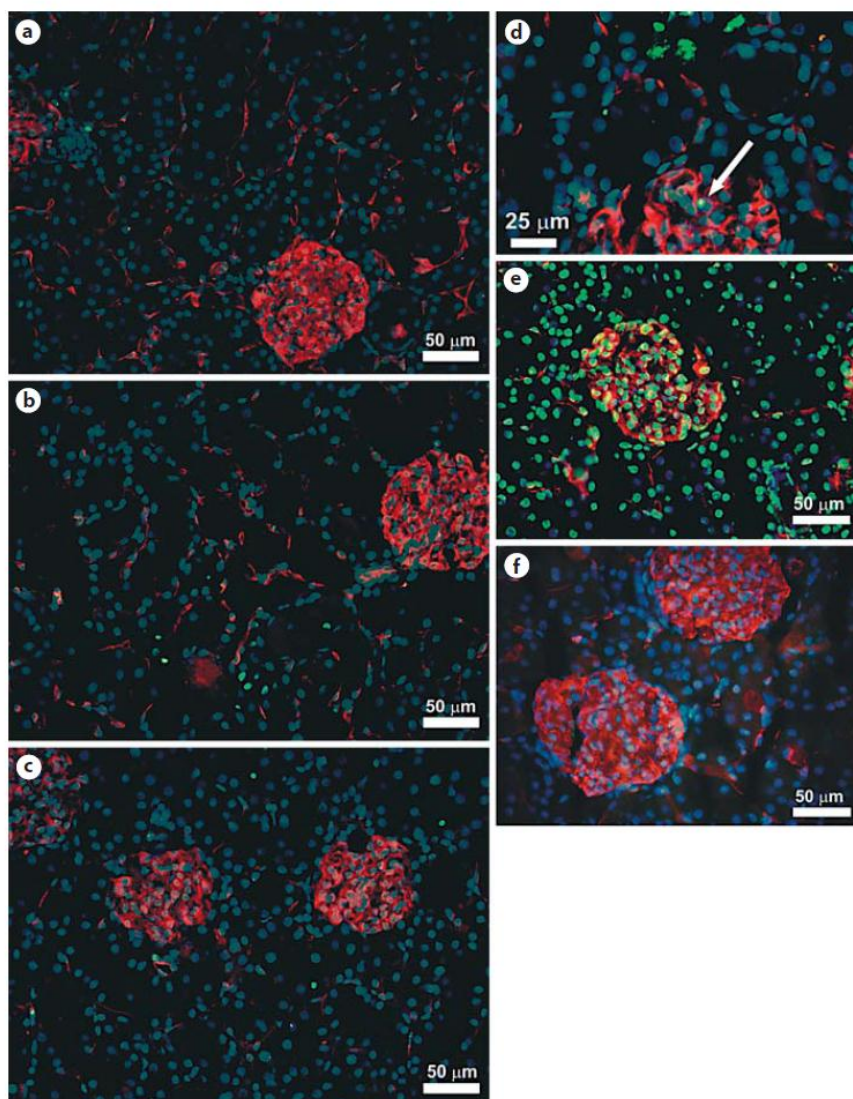


Fig. 5. TUNEL assay in kidney grafts explanted 24 h after transplantation. Representative microphotos. TUNEL (green) in combination with glomerular immunodetection of the glomerular marker podocalyxin-like peptide 1 (red) and nuclei counterstaining with DAPI (blue). Colors refer to the online version only. **a** Control group. **b** UW group. **c** TLM group. **d** UW group: an infrequent example of TUNEL positivity in a glomerulus (arrow). **e** Positive control created by incubating with DNase I recombinant (Roche). **f** Negative control prepared by omitting enzyme solution.

function. In comparison with the conventional use of the UW solution, the TLM obviously improved the 28-day survival rate (62.5 vs. 12.5%; $p < 0.01$) and led to lower creatinine levels 24 h after transplantation. Quantitative histological evaluation 24 h after transplantation showed significantly less advanced tubular damage and lower occurrence of apoptotic cells. Better survival and less tissue injury were without doubt caused by the different cold storage methods, because all other experimental conditions between the UW and TLM groups were identical. Technical reasons may also be excluded, because survival without any cold storage in the control group was 100%

and histological evaluation 24 h after transplantation showed only marginal tubular damage. In addition, autopsy performed in all deceased animals did not disclose any obvious surgical complications. The results of our study thus suggest for the first time that the cold kidney storage by the TLM may significantly improve the outcome of kidney transplantation with prolonged cold ischemia time.

The somewhat low survival rate and advanced kidney damage which was found in the UW group may be explained by a rather long cold ischemia time which we used in order to better disclose the differences between

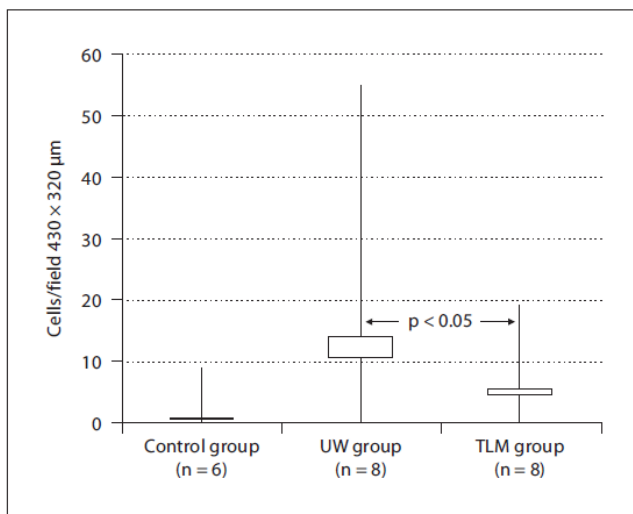


Fig. 6. Rate of TUNEL-positive cells 24 h after transplantation. Mean \pm SEM with min and max values. Comparison between the UW and TLM group by the Mann-Whitney U test.

the cold storage techniques. Other authors using the storage in the UW solution as a standard method usually performed only a unilateral nephrectomy before transplantation which enabled them to investigate the morphology and dynamics of the reparatory process but precluded them from following the onset and early evolution of the graft function [30, 31]. In a paper by Schmitz et al. [32], comparable results were reported in a study arm with 24 h cold storage in the UW solution and pretransplant bilateral nephrectomy.

We were surprised by the rather low rate of apoptosis which is supposed to play an important role in the pathogenesis of the ischemia-reperfusion injury [33]. We performed graft nephrectomy in each subgroup designedly 24 h after transplantation in order to allow the markers of apoptosis to develop. Although the rate of TUNEL-positive cells was significantly lower in the TLM than in the UW group (mean \pm SEM 5 ± 0.5 vs. 12 ± 1.6 cells per $430 \times 320 \mu\text{m}$ area; $p < 0.05$), apoptosis was not frequent and necrosis was the prominent hallmark of tissue damage. Predominance of necrotic cell death was also observed in renal tubular cell culture stored in the cold UW solution. Apoptosis was diminished during the cultivation at low temperature and increased just after re-warming [34].

There are also some limitations of the TUNEL assay which is currently widely used for the detection of apop-

tosis. Its sensitivity and specificity may be affected mainly by sample processing which we tried to overcome by appropriate pretreatment of the sample including microwave irradiation at basic pH values [35]. In general, the rate of apoptosis was similar to that reported by other researchers who studied renal preservation with the UW solution as we did [32, 36]. Surprisingly, we nearly found no apoptotic cells in the glomeruli, which were simultaneously stained by fluorescent antibodies against podocalyxin-like protein 1 for better identification (fig. 5d). The reliability of our TUNEL assay was confirmed by staining of positive and negative control tissue. However, probably due to fixation in Bouin's solution, we were not able to use an alternative technique based on active caspase 3 immunodetection.

In general, it is supposed that the effect of oxygenated PFC correlates with tissue oxygen pressure and intracellular ATP production [37]. In our study, the tissue oxygen pressure was not measured. Nevertheless, with regard to data reported on rat pancreata stored in oxygenated PFC [38], we suppose that due to their similar size the tissue oxygenation of rat kidneys might have been similar. We admit that in a model with larger animals or in humans oxygenation of deeper structures might be questionable. Oxygen penetration from oxygenated PFC into stored pancreas was discussed in several past studies [38–41]. Measurements in porcine pancreas indicated that only a marginal volume of pancreatic tissue was effectively oxygenated by surrounding PFC [39]. On the contrary, observations from autotransplanted canine pancreas suggested a correlation between pancreas oxygenation, tissue oxygen pressure, ATP generation and graft function of ischemically damaged pancreas [40]. Better results with TLM used in small animal models could be achieved with better oxygen penetration into smaller organs [38]. We may speculate that even in larger animals and in humans a superficial oxygen penetration could improve kidney protection and prevent to some extent irreversible destruction of glomeruli and acute tubular necrosis, especially if additional modification such as the use of more lipophilic oxygen carriers with better tissue penetration would be applied [42].

It has also been speculated that preserving the ATP tissue level might not be the only positive effect of PFC [21]. Improvement of tissue oxygenation may also be achieved by other methods such as machine perfusion with oxygenated preservation solution [43]. On the other hand, such methods are rather complex and difficult to use as a routine procedure.

Based on our investigation in a rat model we conclude that the 2-layer organ preservation method significantly improves the outcome of kidney transplantation and should be further studied in larger animals.

Acknowledgement

This study was supported by grant NR/9383-3 from IGA MZ CR.

References

- ▶ 1 Belzer FO, Southard JH: Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45:673–676.
- ▶ 2 Southard JH, Senzig KA, Belzer FO: Effects of hypothermia on canine kidney mitochondria. *Cryobiology* 1980;17:148–153.
- ▶ 3 Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Yamamoto K, Saitoh Y: A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation* 1988;46:457–460.
- ▶ 4 Kuroda Y, Tanioka Y, Morita A, et al: The possibility of restoration of human pancreas function during preservation by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method following normothermic ischemia. *Transplantation* 1994;57:282–285.
- ▶ 5 Kawamura T, Kuroda Y, Suzuki Y, Fujiwara H, Fujino Y, Yamamoto K, Saitoh Y: Seventy-two-hour preservation of the canine pancreas by the two-layer (Euro-Collins' solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1989;47:776–778.
- ▶ 6 Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, et al: Preservation of canine pancreas for 96 h by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1991;51:1133–1135.
- ▶ 7 Kuroda Y, Kawamura T, Tanioka Y, et al: Heart preservation using a cavitory two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1995;59:699–701.
- ▶ 8 Tsujimura T, Suzuki Y, Takahashi T, et al: Successful 24-h preservation of canine small bowel using the cavitory two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Am J Transplant* 2002;2:420–424.
- ▶ 9 Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y: Restoration of pancreas graft function preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method after significant warm ischemia. *Transplantation* 1993;55:227–228.
- ▶ 10 Tanioka Y, Sutherland DE, Kuroda Y, et al: Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery* 1997;122:435–441.
- ▶ 11 Hiraoka K, Trexler A, Eckman E, et al: Successful pancreas preservation before islet isolation by the simplified two-layer cold storage method. *Transplant Proc* 2001;33:952–953.
- ▶ 12 Goto T, Tanioka Y, Sakai T, et al: Application of the two-layer method on pancreas digestion results in improved islet yield and maintained viability of isolated islets. *Transplantation* 2007;83:754–758.
- ▶ 13 Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T, et al: Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia using additional preservation by the two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 2002;74:1687–1691.
- ▶ 14 Tsujimura T, Kuroda Y, Avila JG, et al: Influence of pancreas preservation on human islet isolation outcomes: impact of the two-layer method. *Transplantation* 2004;78:96–100.
- ▶ 15 Caballero-Corbalán J, Eich T, Lundgren T, et al: No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2007;84:864–869.
- ▶ 16 Kin T, Mirbolooki M, Salehi P, et al: Islet isolation and transplantation outcomes of pancreases preserved with University of Wisconsin solution versus two-layer method using preoxygenated perfluorocarbon. *Transplantation* 2006;82:1286–1290.
- ▶ 17 Iwanaga Y, Sutherland DE, Harmon JV, Pappas KK: Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:445–451.
- ▶ 18 Ricordi C, Fraker C, Szust J, et al: Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold-storage solution. *Transplantation* 2003;75:1524–1527.
- ▶ 19 Hanley SC, Paraskevas S, Rosenberg L: Donor and isolation variables predicting human islet isolation success. *Transplantation* 2008;85:950–955.
- ▶ 20 Yamamoto T, Horiguchi A, Ito M, et al: Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;16:131–136.
- ▶ 21 Agrawal A, Gurusamy K, Powis S, Gray DW, Fuller B, Davidson BR: A meta-analysis of the impact of the two-layer method of preservation on human pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* 2008;17:1315–1322.
- ▶ 22 Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814–1827.
- ▶ 23 Maluf DG, Mas VR, Yanek K, et al: Molecular markers in stored kidneys using perfluorocarbon-based preservation solution: preliminary results. *Transplant Proc* 2006;38:1243–1246.
- ▶ 24 Reznik ON, Bagnenko SF, Loginov IV, et al: The use of oxygenated perfluorocarbon emulsion for initial in situ kidney perfusion. *Transplant Proc* 2008;40:1027–1028.
- ▶ 25 Pahlavan PS, Mehrabi A, Kashfi A, et al: Guidelines for prevention and management of complications following kidney transplantation in rats. *Transplant Proc* 2005;37:2333–2337.
- ▶ 26 Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall CS, Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 1983;35:198–204.
- ▶ 27 Potter SR: Expanded criteria donor kidneys: evolution and current practice. *Nephrol News Issues* 2007;21:52, 54, 56.
- ▶ 28 Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM: Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:114–125.
- ▶ 29 Gerstenkorn C: Non-heart-beating donors: renewed source of organs for renal transplantation during the twenty-first century. *World J Surg* 2003;27:489–493.
- ▶ 30 Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Heemann UW, Marquet RL, Ijzermans JN: Late graft dysfunction after prolonged cold ischemia of the donor kidney: inhibition by cyclosporine. *Transplantation* 1999;68:1004–1010.
- ▶ 31 Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH: Evaluation of a novel cold storage solution (HBs) in a rat kidney transplant model. *J Invest Surg* 2007;20:257–263.
- ▶ 32 Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Peart J, et al: Impact of organ preservation using HTK for graft flush and subsequent storage in UW in rat kidney transplantation. *Eur Surg Res* 2006;38:388–398.
- ▶ 33 Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV: Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998;66:872–876.

- ▶ 34 Salahudeen AK, Joshi M, Jenkins JK: Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 2001;72:798–804.
- ▶ 35 Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, et al: TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 1998;46:327–334.
- ▶ 36 Hoeger S, Petrov K, Reisenbuechler A, Fontana J, Selhorst J, Hanusch C, et al: The additional detrimental effects of cold preservation on transplantation-associated injury in kidneys from living and brain-dead donor rats. *Transplantation* 2009;87:52–58.
- ▶ 37 Matsumoto S, Kuroda Y, Fujita H, Tanioka Y, Kim Y, Sakai T, et al: Resuscitation of ischemically damaged pancreas by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) mild hypothermic storage method. *World J Surg* 1996;20:1030–1034.
- ▶ 38 Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Papas KK: The rat pancreas is not an appropriate model for testing the preservation of the human pancreas with the two-layer method. *Transplantation* 2006;81:1471–1472.
- ▶ 39 Papas KK, Hering BJ, Guenther L, Rappel MJ, Colton CK, Avgoustiniatos ES: Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplant Proc* 2005;37:3501–3504.
- ▶ 40 Matsumoto S, Kuroda Y, Hamano M, et al: Direct evidence of pancreatic tissue oxygenation during preservation by the two-layer method. *Transplantation* 1996;62:1667–1670.
- ▶ 41 Kuroda Y, Fujino Y, Morita A, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y: Oxygenation of the human pancreas during preservation by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold-storage method. *Transplantation* 1992;54:561–562.
- ▶ 42 Brandhorst H, Theisinger B, Yamaya H, et al: Perfluorohexyloctane improves long-term storage of rat pancreata for subsequent islet isolation. *Transpl Int* 2009;22:1017–1022.
- ▶ 43 Maathuis MH, Manekeller S, van der Plaats A, et al: Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg* 2007;246:982–988.

Příloha B

Gene Expression Changes in Rat Pancreas Transplant Model after Graft Long-Term Cold Storage in Perfluorohexyloctane

Marada T, Zacharovova K, Brabcova I, Fabryova E

Transplantation Proceedings

2013, v tisku

ABSTRACT

Gene Expression Changes in Rat Pancreas Transplant Model after Graft Long-Term Cold Storage in Perfluorohexyloctane

Background: Perfluorohexyloctane (PFH) is a promising storage solution that has been successfully used for pancreas preservation before islet isolation. This hyperoxygen carrier has been designed to prevent ischaemic injury to the pancreas graft during cold storage. In our study, we aimed to evaluate the impact of this solution on long-term cold storage in a rat whole pancreas transplantation model.

Method: Brown-Norway rats were used for syngeneic heterotopic pancreas transplantation. The procured organs were cold-stored for 18 hours in preoxygenated PFH (PFH group) (n=8) or in the University of Wisconsin solution (UW group) (n=8) or were transplanted immediately in the control group (n=8). Two hours after reperfusion, we obtained blood and pancreas tissue samples for biochemistry and gene analyses (real-time PCR).

Results: A significant difference between the UW and PFH group was observed in the TNF β and endothelin 1 genes, which was overexpressed more than twofold in the UW group. In the blood samples, the UW group compared with the PFH group showed significantly higher levels of pancreatic amylase and lipase (94.2 ± 25.2 vs. 67.7 ± 13.4 μ kat/l and 5.5 ± 2.8 vs. 3 ± 0.7 μ kat/l, respectively; $p < 0.05$).

Conclusion: We found significantly lower expression levels of the endothelin 1 and TNF β genes and lower concentrations of pancreatic amylase and lipase in the PFH group. All these findings suggest lower rate of ischaemic reperfusion injury in the PFH group. These findings may result in better post-transplant outcomes after long-term cold storage in PFH compared with the UW solution. Further research in this area is required.

Gene Expression Changes in Rat Pancreas Transplant Model after Graft Long-Term Cold Storage in Perfluorohexyloctane

T. Marada, K. Zacharovova*, I. Brabcova** and E. Fabryova*

Department of Transplant Surgery, Diabetes Center* and Center for Experimental Medicine**, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Email addresses: tomd@medicon.cz, klara.zacharovova@ikem.cz,
irena.brabcova@ikem.cz, eva.vodraskova@ikem.cz

Corresponding author:

Tomáš Marada, MD,
Department of Transplant Surgery,
Institute for Clinical and Experimental Medicine,
Víteňská 1958/9, Prague, 140 21,
tel.: +420 261362246, fax: +420 261362822,
e-mail: tomd@medicon.cz

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for the development of research organisation 00023001 (IKEM, Prague, Czech Republic) – Institutional support (Grant 9017 2011-2012).

Number of tables:

Table – 1

Graph – 1

INTRODUCTION

Pancreas transplantation is an important treatment modality to cure type I diabetes and maintain complete insulin independence. The American Diabetes Association states that pancreas transplantation is an acceptable therapeutic alternative to continued insulin therapy in diabetic patients with imminent or established end-stage renal disease who will receive a kidney transplant [1]. Progressive improvement in this field has increased its use worldwide [2,3]. The improvements in outcome are attributed mainly to better recipient care with respect to the surgical techniques and immunosuppressive regimens as well as to better organ procurement and preservation protocols. In terms of pancreas preservation, the University of Wisconsin solution (UW) has been the gold standard for more than 20 years [4]. However, several reports have suggested that other preservation solutions may be effective alternatives to the UW [5,6,7]. One type involves perfluorocarbons (PFCs), which have been reported with different results until recently, and it is still undergoing many improving modifications with promising results [8,9,10].

PFCs are hydrocarbons in which all or most of the hydrogen atoms have been replaced with fluorine. They have twice the density of water. The most attractive attribute of PFCs is their high capacity for dissolving respiratory and other nonpolar gases [11]. The oxygen solubility in PFC is approximately 25 times higher than that in water or blood plasma. Temperature does not significantly influence oxygen binding by PFCs, which makes them attractive solutions for hypothermic organ preservation. PFC was first used for pancreas preservation as a component of the two-layer method (TLM) by Kuroda et al. in 1988 [12]. The first experiments with TLM demonstrated that canine pancreases could be preserved for up to 96 hours [13]. The TLM has been also adapted to simplify it for clinical use. Several experiments demonstrated that the continual oxygenation of PFC was not necessary and that preoxygenation could sufficiently maintain oxygen tension for up to 18 hours [14]. However, PFC improved cold storage in many experiments [15,16,17], and in particular, its clinical application was successful in pancreas preservation before islet isolation [18]. Nevertheless, a large clinical study did not find any benefit to islet transplantation outcomes [19,20]. This controversy was explained by the small oxygen penetration into a larger organ [21]. Comparative studies in rat and human pancreases suggested that pancreas preservation can be significantly improved using perfluorohexyloctane (PFH), a semifluorinated alkane that is characterised by an increased lipophilicity and lower density, which facilitates the penetration of oxygen into the deeper tissue layers of stored organs, than the previously used perfluorodecalin (PFD) [22]. This modification significantly improved islet isolation outcome after prolonged CIT compared with PFD [23,24,25].

The use of PFH proved the importance of PFCs for pancreas preservation before islet isolation even in clinical applications [24]. Despite the successes in this field, islet transplantation is still inferior to pancreas transplantation in the transplant-based treatment of diabetes. The transplantation of islets may require more than one donor pancreas, and the recovery of endocrine function currently appears more durable with a whole pancreas [26,27]. Therefore, in the present experimental trial, we assessed the possible efficiency of PFH for long-term storage in a rat whole pancreas transplantation model.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Inbred male Brown-Norway (BN) rats (280-330 g, Charles River, Germany) were used as donors and recipients for syngeneic pancreas transplantation. The animals were housed for more than 1 week before surgery in a temperature-controlled (23°C) room with a 12 hour light/dark cycle and free access to water and rodent chow.

All experiments were approved by the local Animal Care and Use Committee and complied with the animal care protection law of the Czech Republic and with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication Vol 25, No. 28 revised 1996).

EXPERIMENTAL GROUPS

Before transplantation, the animals were randomly allocated into 3 groups. The donor pancreaticoduodenal graft was recovered and stored for 18 hours in cold (4°C) UW solution (UW group, n=8) or preoxygenated PFH (PFH group, n=8) or was transplanted immediately without any cold storage (control group, n=8).

PANCREAS TRANSPLANTATION

The heterotopic pancreas transplantation was performed using a modified Lee’s technique [28]. The pancreas was exposed from a middle abdomen incision and explanted without touching the organ, which was protected with wet wraps during the operation. The pancreas was procured with a duodenal and aortic segment as a pancreaticoduodenal graft for heterotopic transplantation onto abdominal vessels and duodenojejuno side-to-side anastomosis for enteric drainage.

All microsurgical procedures were performed under a microscope with x2.5–5 magnification by the same surgeon. The animals were placed in the supine position on a heated pad to maintain a constant body temperature between 36 and 37°C during the operation. The donors and recipients were anesthetised by an intramuscular injection of ketamine (10 mg/100 g; Narkamon, Spofa, Prague, Czech Republic) and xylazine (1.5 mg/100 g; Rometar, Spofa, Prague, Czech Republic).

The pancreas was flushed in vivo immediately after aortic cross clamping via an aortic segment with 5 ml of cold saline and 100 IU of heparin and with 5 ml of cold UW solution. The explanted organ was stored for 18 hours in cold UW solution (4°C) or cold preoxygenated PFH (Novaliq GmbH, Heidelberg, Germany) (100% O₂ for 20 minutes) according to the group assignment. In the control group, we transplanted the organs immediately. In terms of preservation in preoxygenated PFH, we primarily ensured that the entire organ was immersed for optimal oxygenation during storage.

The pancreas was transplanted heterotopically with end-to-side vascular anastomoses performed using a 9-0 suture of the graft’s aortic segment and portal vein to the exposed abdominal subrenal aorta and inferior caval vein, respectively. Duodenojejunal side-to-side anastomosis was performed with a 7-0 suture. All vascular anastomoses were sewn manually with a mean manipulation time of 26 min (range 20–34 min) without significant differences between the groups. The abdomen was closed after the subcutaneous and intraperitoneal administration of 5 ml of a warm saline solution and 5 ml of a 5% glucose solution.

The anaesthetised recipients were kept on a heated pad for 2 hours. After that interval, we collected 2 ml of blood for biochemistry and procured the pancreaticoduodenal graft for gene analysis. The recipients were then sacrificed by exsanguinations under ongoing general anaesthesia.

The technical success of this technique was proven before the experimental trial using a group of 6 isogenic transplantations. Brown-Norway rats with streptozotocin-induced diabetes (administrated intravenously at a dose of 70 mg/kg 7 days before the surgery), which were described as having hyperglycaemia greater than 18 mmol/l measured on three consecutive days, underwent heterotopic pancreaticoduodenal transplantation as described above. After transplantation, we found the normalisation of glycaemia in daily measurements from the first postoperative day and normal IVGTT measured 2 weeks after transplantation.

BLOOD ANALYSIS

The pancreatic amylase and lipase concentrations in serum were analysed by the Institute for Clinical and Experimental Medicine Laboratory using standard assays.

PCR

Pancreatic tissue was homogenised, and after treatment with DNaseI, total RNA was extracted using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For this isolation, the QIAcube machine (Qiagen, Hilden, Germany) was used. RNA was eluted in 14 µl of RNase-free water and quantified by a UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA). The samples were stored at – 80°C. The RNA was used for cDNA synthesis using Superscript II Reverse Transcriptase (Nitrogen, CA, United States) according to the manufacturer's instructions.

The gene expression profile of 7 target genes known to be associated with ischaemic reperfusion (IR) damage - Bcl2 (B-cell leukaemia/lymphoma 2), Bax (Bcl2-associated X protein), Hmox1 (heme oxygenase 1), Edn1 (endothelin 1), Hspd1 (heat shock protein 1), Lta resp. TNFβ (lymphotoxin alpha resp. tumour necrosis factor β) and Sod1 (superoxide dismutase 1) - was determined using a quantitative real-time RT-PCR method with GAPDH as an internal control and cDNA from a one control sample serving as the calibrator for 31 tissue samples. The mRNA quantification was performed in triplicate using a pre-design TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) and fast protocol (TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems, CA, USA). RT-qPCR amplification was performed on an ABI Prism® 7900 H.T. Sequence Detection system (Applied Biosystems, CA, USA). The 96 well plates were analysed by relative quantification (RQ), and the RQ manager 1.2. software for automated data analysis was used (Applied Biosystems, CA, USA).

Statistical Analysis

The data were expressed as mean +/-SD. The differences between groups were assessed by the Mann-Whitney U test. The differences were considered significant at p level <0.05.

RESULTS

Surgery

We did not find a significant difference in the operative time (e.g., time of pancreas procurement, vascular anastomosis) among the three groups. We also did not observe any technical failings such as postreperfusion bleeding, hypoperfusion or vascular thrombosis in the three groups. The pancreas reperfusion was prompt and homogenous, with the pancreatic tissue acquiring a pink colour in all cases across the experimental groups.

Biochemistry

The blood samples in the UW group compared with the PFH group showed significantly higher levels of pancreatic amylase and lipase (94.2 ± 25.2 vs. 67.7 ± 13.4 $\mu\text{kat/l}$ and 5.5 ± 2.8 vs. 3 ± 0.7 $\mu\text{kat/l}$, respectively, $p < 0.05$). A significant difference was also found between the control and the two other groups (55.4 ± 14.8 and 1.9 ± 0.8 $\mu\text{kat/l}$, respectively, $p < 0.05$) (GRAPH).

Gene expression

We evaluated the changes in the expression of seven genes after two hours of reperfusion in the transplanted pancreas following the 18 hour cold storage in the PFH or UW solution and in the control group.

A significant difference between the UW and PFH groups was observed for the TNF β and endothelin 1 genes, which were more than twofold overexpressed in the UW group (TAB). For the remaining genes, we did not find any significant differences between the experimental groups.

DISCUSSION

IR injury is characterised by multiple pathophysiological changes in the pancreas tissue. Just during reperfusion, many proinflammatory mechanisms are activated. In our experiment, we selected an interval of 2 hours after reperfusion for the proinflammatory gene analysis, which has been used in other experiments studying IR-induced gene expression in a rat pancreas transplant model [29,30]. This interval appears to be suitable to identify early IR changes and potentially quantify its severity.

In our measurements, we identified differences in the gene expression of endothelin 1 and TNF β . Endothelin 1 plays important roles in many physiological and pathophysiological activities [31]. It is induced by hypoxia [32] through hypoxia-inducible factor 1 [33]. This mechanism could correlate with our findings, in which a pancreas stored in a preoxygenated solution (PFH group) showed a lower expression of this gene.

The overexpression of endothelin 1 is associated with pancreatitis [34,35]. The correlation between IR injury and posttransplant graft pancreatitis is well known [36]. Graft pancreatitis as a result of IR injury is still one of the most severe complications, occurring with an incidence in the range of 17%–35%, and it impairs graft survival [37,38]. Based on our results, we hypothesise that the storage in preoxygenated PFH leads to a lower expression of endothelin 1 due to better tissue oxygenation during the preservation process. In this group, we also observed milder biochemical signs of pancreatitis (lower levels of amylase and lipase). The possible reduction of graft pancreatitis using PFH storage could therefore improve graft survival.

The higher expression of TNF β could be explained by its association with endothelin 1 expression during IR injury [39]. This finding also suggests a lower IR reaction in the PFH group.

An interesting future step would be the evaluation of posttransplant function and survival, which could not be performed in our experiment due to the need to collect the tissue for gene analysis. Given the controversial experiences with TLM that have shown different results in small and large animal experimental models, future studies with PFH in a large animal model are necessary.

In conclusion, we found significantly lower expressions of the endothelin 1 and TNF β genes and lower concentrations of amylase and lipase in the PFH group. All these findings demonstrate a lower rate of IR injury in the PFH group. These findings may indicate better posttransplant outcomes after long-term cold storage in perfluorohexyloctane compared with the UW solution. However, further research in this field is required.

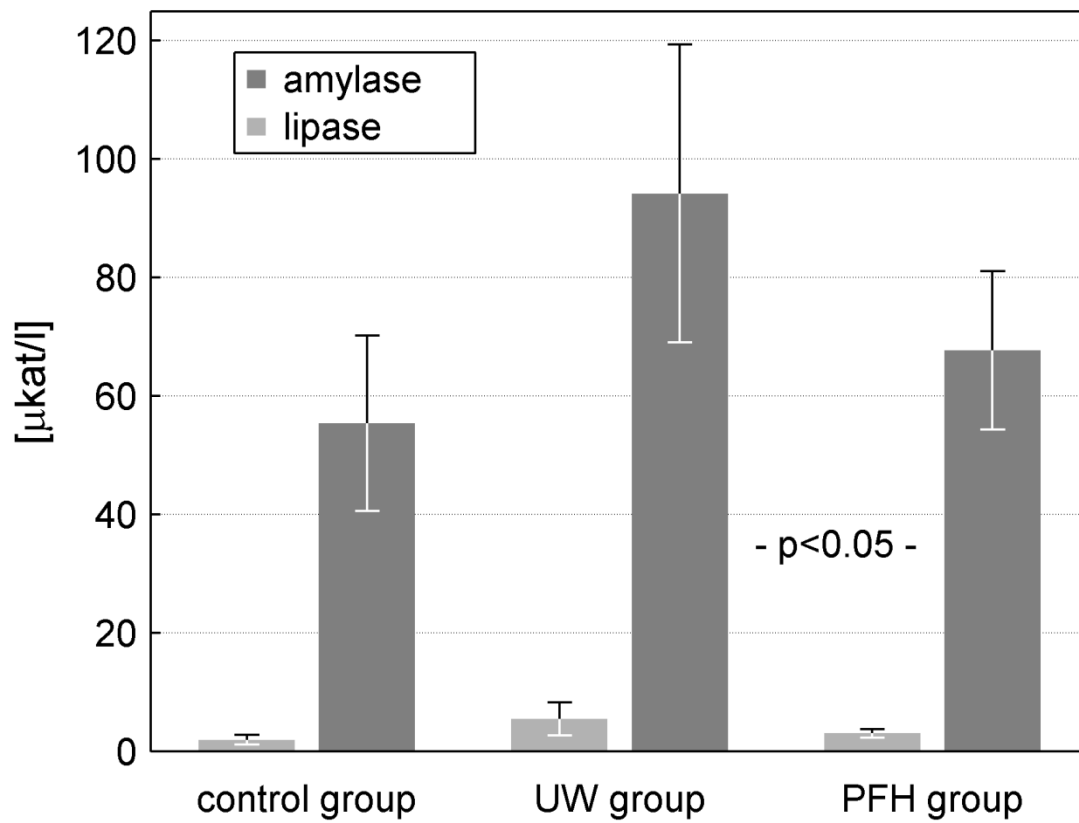
REFERENCES

1. Robertson P, Davis C, Larsen J, et al. Pancreas transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(Suppl 1): S105.
2. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant* 2005; 19: 433.
3. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Clin Transpl* 2008: 45.
4. D'Alessandro AM, Stratta RJ, Sollinger HW, et al. Use of UW solution in pancreas transplantation. *Diabetes* 1989; 38: 7.
5. Agarwal A, Murdock P, Pescovitz MD, et al. Follow-up experience using histidine-tryptophan ketoglutarate solution in clinical pancreas transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3523.
6. Boggi U, Vistoli F, Del Chiaro M, et al. Pancreas preservation with University of Wisconsin and Celsior solutions: a single-center, prospective, randomized pilot study. *Transplantation* 2004; 77: 1186.
7. Matsumoto S, Kandaswamy R, Sutherland DE, et al. Clinical application of the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation before transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 771.
8. Hosgood SA, Nicholson ML. The role of perfluorocarbon in organ preservation. *Transplantation* 2010; 89: 1169.

9. Matsumoto S. Clinical application of perfluorocarbons for organ preservation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005; 33: 75.
10. Matsumoto S, Kuroda Y. Perfluorocarbon for organ preservation before transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 1804.
11. Lowe KC, Davey MR, Power JB. Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 272.
12. Kuroda Y, Kawamura T, Suzuki Y, et al. A new, simple method for cold storage of the pancreas using perfluorochemical. *Transplantation* 1988; 46: 457.
13. Kin S, Stephanian E, Gores P, et al. 96-hour cold-storage preservation of the canine pancreas with oxygenation using perfluorochemical. *Transplantation* 1993; 55: 229.
14. Hiraoka K, Trexler A, Eckman E, et al. Successful pancreas preservation before islet isolation by the simplified two-layer cold storage method. *Transplant Proc* 2001; 33: 952.
15. Kuroda Y, Kawamura T, Tanioka Y, et al. Heart preservation using a cavitory two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1995; 59: 699.
16. Kuroda Y, Sakai T, Suzuki Y, et al. Small bowel preservation using a cavitory two-layer (University of Wisconsin/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1996; 61: 370.
17. Marada T, Zacharovova K, Saudek F. Perfluorocarbon improves posttransplant survival and early kidney function following prolonged cold ischemia. *Eur Surg Res* 2010; 44: 170.
18. Lakey JR, Tsujimura T, Shapiro AM, et al. Preservation of the human pancreas before islet isolation using a two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 2002; 74: 1809.
19. Kin T, Mirbolooki M, Salehi P, et al. Islet isolation and transplantation outcomes of pancreas preserved with University of Wisconsin solution versus two-layer method using preoxygenated perfluorocarbon. *Transplantation* 2006; 82: 1286.
20. Caballero-Corbalan J, Eich T, Lundgren T, et al. No beneficial effect of two-layer storage compared with UW-storage on human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 864.
21. Avgoustiniatos ES, Hering BJ, Papas KK. The rat pancreas is not an appropriate model for testing the preservation of the human pancreas with the two-layer method. *Transplantation* 2006; 81: 1471.

22. Hoerauf H, Kobuch K, Dresch J, et al. Combined use of partially fluorinated alkanes, perfluorocarbon liquids and silicone oil: an experimental study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239: 373.
23. Brandhorst H, Iken M, Scott WE, et al. Quality of isolated pig islets is improved using perfluorohexyloctane for pancreas storage in a split lobe model. *Cell Transplant* 2012 [Epub ahead of print]
24. Brandhorst H, Asif S, Andersson K, et al. A new oxygen carrier for improved long-term storage of human pancreata before islet isolation. *Transplantation* 2010; 89: 155.
25. Brandhorst H, Theisinger B, Yamaya H, et al. Perfluorohexyloctane improves long-term storage of rat pancreata for subsequent islet isolation. *Transpl Int* 2009; 22: 1017.
26. Rickels MR. Recovery of endocrine function after islet and pancreas transplantation. *Curr Diab Rep* 2012; 12: 587.
27. Girman P, Saudek F. The IKEM pancreas and islet transplant program as part of healthcare for type 1 diabetes patients: retrospective analysis of outcome from 1983 to 2010. *Rev Diabet Stud* 2011; 8: 35.
28. Lee S, Scott M, de Macedo AR. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. A technique update. *Transplantation* 1986; 42: 327.
29. Drognitz O, Michel P, Koczan D, et al. Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 1428.
30. Preissler G, Massberg S, Eichhorn ME, et al. Islets of Langerhans are protected from inflammatory cell recruitment during reperfusion of rat pancreas grafts. *Eur Surg Res* 2010; 44: 192.
31. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, et al. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 2011; 25: 16.
32. Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamaru M, et al. Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169: 973.
33. Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, et al. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 894.
34. Oz HS, Lu Y, Vera-Portocarrero LP, et al. Gene expression profiling and endothelin in acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4257.

35. Zhang XP, Zhang J, Ma ML, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 83.
36. Benz S, Bergt S, Obermaier R, et al. Impairment of microcirculation in the early reperfusion period predicts the degree of graft pancreatitis in clinical pancreas transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 759.
37. Fernandez-Cruz L, Sabater L, Gilabert R, et al. Native and graft pancreatitis following combined pancreas-renal transplantation. *Br J Surg* 1993; 80: 1429.
38. Stratta RJ, Taylor RJ, Lowell JA, et al. Selective use of Sandostatin in vascularized pancreas transplantation. *Am J Surg* 1993; 166: 598.
39. Ruetten H, Thiernemann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 675.



This graph indicates the average plasma levels \pm SD of amylase and lipase in each of the groups. We found significant difference among UW and PFH groups for both parameters.

Gene symbol	Gene name	Gene expression in control group	Gene expression in UW group	Gene expression in PFH group
Bax	Bcl2-associated X protein	0.88	0.80	0.60
Bcl2	B-cell leukaemia/lymphoma 2	1.29	0.68	1.03
Edn1	endothelin 1	2.00	3.33*	1.31*
Hmox1	heme oxygenase 1	0.76	0.23	0.30
Hspd1	heat shock protein 1	1.88	2.19	1.53
Lta (TNF β)	lymphotoxin alpha	0.90	0.80*	0.38*
Sod1	superoxide dismutase 1	1.27	1.33	1.20

This table shows the average expression value of the genes in each of experimental groups. The asterisk (*) indicates a significant difference among the groups ($p < 0.05$).